



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110799652 A

(43)申请公布日 2020.02.14

(21)申请号 201880036852.2	(51)Int.Cl.
(22)申请日 2018.03.29	<i>C12Q 1/02</i> (2006.01)
(30)优先权数据	<i>A61K 45/00</i> (2006.01)
62/478,382 2017.03.29 US	<i>A61P 35/00</i> (2006.01)
62/607,880 2017.12.19 US	<i>A61P 35/04</i> (2006.01)
(85)PCT国际申请进入国家阶段日	<i>A61P 29/00</i> (2006.01)
2019.11.29	<i>C07D 471/04</i> (2006.01)
(86)PCT国际申请的申请数据	<i>C07D 471/10</i> (2006.01)
PCT/US2018/025107 2018.03.29	<i>C07D 211/16</i> (2006.01)
(87)PCT国际申请的公布数据	<i>C07D 471/20</i> (2006.01)
W02018/183654 EN 2018.10.04	<i>C07D 401/04</i> (2006.01)
(71)申请人 米纳瓦生物技术公司	<i>C07D 213/40</i> (2006.01)
地址 美国马萨诸塞州	<i>C07D 217/02</i> (2006.01)
(72)发明人 C·巴姆达德 S·莫	<i>C07D 401/06</i> (2006.01)
(74)专利代理机构 深圳市百瑞专利商标事务所	<i>C07D 417/04</i> (2006.01)
(普通合伙) 44240	<i>C07D 211/18</i> (2006.01)
代理人 金辉	<i>C07D 213/75</i> (2006.01)
	<i>C07D 295/185</i> (2006.01)

权利要求书14页 说明书125页
序列表12页 附图137页

(54)发明名称

分化干细胞和治疗癌症的药剂

(57)摘要

本申请公开了一种鉴定用于治疗或预防癌症或转移性癌症的药剂的方法,该方法包括以下步骤:使干细胞与潜在药物接触,和鉴定诱导分化、或抑制干细胞多能性或干细胞生长的药剂,其中这样的药剂被确定为抗癌剂。

1. 一种鉴定用于治疗或预防癌症或转移性癌症的药剂的方法,包括以下步骤:
 - (i) 使干细胞与潜在药剂接触,
 - (ii) 鉴定诱导分化或抑制干细胞多能性或干细胞生长的药剂,其中这样的药剂被确定为抗癌剂。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述干细胞是幼稚状态干细胞。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中在步骤(i)中,所述干细胞是幼稚状态或始发状态干细胞,其中将所述药剂对幼稚状态干细胞的效果与对始发状态干细胞的效果进行比较,其中如果与始发状态干细胞相比,药剂对幼稚状态干细胞具有更明显的效果,则该药剂确定为抗癌剂。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中,药剂是多克隆抗体、单克隆抗体、抗体样分子、抗体片段融合蛋白、抗体模拟物、肽、肽模拟物、小分子或天然产物。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述干细胞是人的。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中,通过在包含NME7_{AB}的培养基中进行培养,将干细胞维持为幼稚状态。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中,通过在包含NME7-X1的培养基中进行培养,将干细胞维持为幼稚状态。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、前列腺癌、结肠癌、肺癌或胰腺癌。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症是MUC1阳性或MUC1*阳性癌症。
10. 根据权利要求1的方法,其中所述癌症是NME7_{AB}阳性癌症。
11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症是NME7-X1阳性癌症。
12. 根据权利要求1所述的方法,其中,药剂通常没有细胞毒性。
13. 根据权利要求1的方法,其中,药剂对成纤维细胞或成纤维祖细胞没有细胞毒性。
14. 一种预防或治疗癌症的方法,包括对受试者给予通过根据权利要求1所述的方法获得的药剂。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、前列腺癌、结肠癌、肺癌或胰腺癌。
16. 根据权利要求14所述的方法,其中所述癌症是MUC1阳性或MUC1*阳性癌症。
17. 根据权利要求14所述的方法,其中所述癌症是NME7_{AB}阳性癌症。
18. 根据权利要求14所述的方法,其中所述癌症是NME7-X1阳性癌症。
19. 一种预防癌症转移的方法,其包括向所述受试者给予通过根据权利要求1所述的方法获得的药剂。
20. 一种抑制癌症生长、迁移或侵袭性的方法,包括对受试者给予通过根据权利要求1所述的方法获得的药剂。
21. 一种抑制转移性癌细胞生长的方法,其包括对受试者给予通过根据权利要求1所述的方法获得的药剂。
22. 一种鉴定用于药物发现的抗癌或抗转移靶标的方法,包括鉴定与始发状态干细胞相比在幼稚状态干细胞中上调的基因或基因产物。
23. 一种鉴定用于药物发现的抗癌或抗转移靶标的方法,包括鉴定与始发状态干细胞

相比在幼稚状态干细胞中下调的基因或基因产物。

24. 一种鉴定抗癌或抗转移药剂的方法,包括

- (i) 鉴定与始发状态干细胞相比在幼稚状态干细胞中下调的基因或基因产物;
- (ii) 使幼稚干细胞与药剂接触;和
- (iii) 鉴定增加在幼稚状态干细胞中下调的基因或基因产物的表达或活性的药剂。

25. 一种鉴定抗癌或抗转移药剂的方法,包括

- (i) 鉴定与始发状态干细胞相比在幼稚状态干细胞中上调的基因或基因产物;
- (ii) 使幼稚干细胞与药剂接触;和
- (iii) 鉴定抑制在幼稚状态干细胞中上调的基因或基因产物的表达或活性的药剂。

26. 一种鉴定抗癌或抗转移药剂的方法,包括

- (i) 鉴定与成纤维细胞相比在幼稚状态干细胞中上调的基因或基因产物;
- (ii) 使幼稚干细胞与药剂接触;和
- (iii) 鉴定抑制在幼稚状态干细胞中上调的基因或基因产物的表达或活性的药剂。

27. 一种鉴定抗癌或抗转移药剂的方法,包括

- (i) 鉴定与成纤维细胞相比在幼稚状态干细胞中下调的基因或基因产物;
- (ii) 使幼稚干细胞与药剂接触;和
- (iii) 鉴定增加在幼稚状态干细胞中下调的基因或基因产物的表达或活性的药剂。

28. 根据权利要求25或26所述的方法,其中,所述上调的基因是E-钙黏着蛋白、CXCR4、 β -连环蛋白、AXIN2、MUC1、NME7或NME7-X1。

29. 根据权利要求25或26所述的方法,其中,上调的基因是CXCR4。

30. 根据权利要求24或27所述的方法,其中所述下调的基因是当干细胞开始分化时上调的基因。

31. 根据权利要求24或27所述的方法,其中,所述下调的基因是纤连蛋白、波形蛋白或NF1。

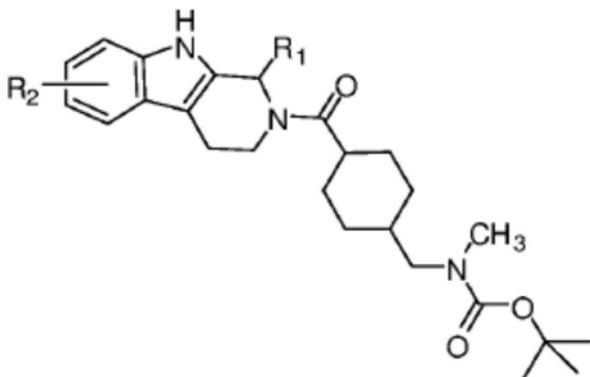
32. 根据权利要求24或27所述的方法,其中,所述下调的基因是微RNA-145。

33. 根据权利要求24或27所述的方法,其中,所述下调的基因是超增强子靶基因,例如HES3、GNAS、VLDLR、EXT1、FBXL17、RHOC或GREB1L。

34. 一种鉴定抗癌或抗转移药剂的方法,包括

- (i) 鉴定与始发干细胞或成纤维细胞相比在幼稚状态干细胞中上调的微RNA;
- (ii) 使幼稚干细胞与药剂接触;和
- (iii) 鉴定抑制在幼稚状态干细胞中上调的微RNA的表达或活性的药剂。

35. 具有式1的化合物:



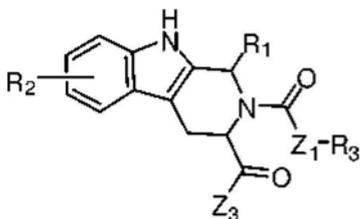
其中，

R1是H、任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C3-C4环烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C1-C6烷氧基；任选取代的C6-C12芳基；具有1-4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基；任选取代的C7-C15芳基烷基，例如但不限于苄基或 α -甲基苄基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C2-C15杂芳基烷基；任选取代的C7-C15芳基烯基；任选取代的C3-C8环烷基；或任选取代的C4-C8环烷基烷基；以及

R2是氢、C1-C6烷氧基例如但不限于甲氧基或乙氧基、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H；

其中，“取代的”是指被独立地选自以下的一个或多个取代：卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-OCH₃、-OC₂H₅、-O-C1-C4烷基、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

36. 具有式2的化合物：



其中，

R1是H、任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C1-C6烷氧基；任选取代的C6-C12芳基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基；任选取代的C7-C15芳基烷基例如但不限于苄基或 α -甲基苄基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C2-C15杂芳基烷基；任选取代的C7-C15芳基烯基；任选取代的C3-C8环烷基；或任选取代的C4-C8环烷基烷基；

R2是氢、C1-C6烷氧基例如但不限于甲氧基或乙氧基、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H；

Z1是键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH₃)-、-(CH₂)_n-、-C3-C7环烷基-CH₂-、-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO₂-或-C(=NH)-、-CH₂NH(CO)-、-CH₂NH(CO)O-、-CH₂NH(CO)NH-；-(CH₂)_nNH(CO)-、-(CH₂)_nNH(CO)O-、-(CH₂)_mNH(CO)NH-；-C3-C7环烷基-CH₂NH(CO)-、-C3-C7环烷基-CH₂NCH₃(CO)-、-C3-C7环烷基-CH₂NH(CO)O-、-C3-C7环烷基-CH₂NCH₃(CO)O-、-C3-C7环烷基-CH₂NH

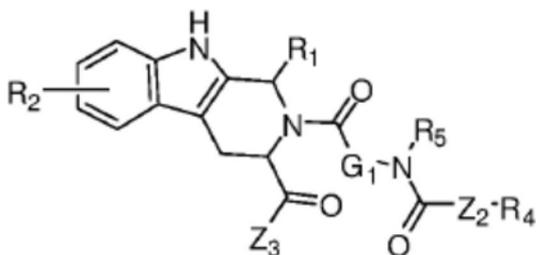
(CO)NH-、-C3-C7环烷基-CH₂NCH₃(CO)NH-、-(CH₂)_nN(CH₂CH₂C₆H₅)-或任选取代的C₆-C₁₂芳基；

Z₃是-OH、-OCH₃、-O-C₁-C₆烷基、-O-CH₂C₆H₅、-NH₂、-NH(C₁-C₆烷基)、-N(C₁-C₆烷基)2、-C₁-C₆烷基；以及

R₃是H、任选取代的C₁-C₉烷基、C₂-C₆烯基；任选取代的C₆-C₁₂芳基、具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C₁-C₉杂芳基；任选取代的C₇-C₁₅芳基烷基例如但不限于苄基或α-甲基苄基；或任选取代的C₃-C₇环烷基；-(CH₂)_n-NH(CO)O-(C₁-C₆烷基)；-CH₂O(CH₂)_p-NH(CO)O-(C₁-C₆烷基)；-(CH₂)_p-NHCO-(CH₂)_m-NH(CO)O-(C₁-C₆烷基)；-NH(CO)O-叔丁基；-O-叔丁基；或-叔丁基；CONH-芳基，其中，m=1-5，n=1-8以及p=1-9，

其中，“取代的”是指被独立地选自以下的一个或多个取代：卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C₁-C₆烷氧基、C₁-C₆烷基、-OH、-OCH₃、-OC₂H₅、-O-C₁-C₄烷基、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

37. 根据权利要求36所述的化合物，其中，所述化合物具有式3：



其中，

R₁是H、任选取代的C₁-C₆烷基；任选取代的C₂-C₆烯基；任选取代的C₁-C₆烷氧基；任选取代的C₆-C₁₂芳基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C₁-C₉杂芳基；任选取代的C₇-C₁₅芳基烷基例如但不限于苄基或α-甲基苄基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C₂-C₁₅杂芳基烷基；任选取代的C₇-C₁₅芳基烯基；任选取代的未取代的C₃-C₈环烷基；或任选取代的C₄-C₈环烷基烷基；

R₂是氢、C₁-C₆烷氧基例如但不限于甲氧基或乙氧基、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C₁-C₆烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H；

G₁是键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH₃)-、-(CH₂)_n-、-C₃-C₇环烷基、-C₃-C₇环烷基-CH₂-、-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO₂-或-C(=NH)-、-CH₂NH(CO)-、-CH₂NH(CO)O-、-CH₂NH(CO)NH-、-(CH₂)_nNH(CO)-、-(CH₂)_nNH(CO)O-、-(CH₂)_mNH(CO)NH-；-C₃-C₇环烷基-NH(CO)-、-C₃-C₇环烷基-CH₂NH(CO)O-、-C₃-C₇环烷基-NH(CO)NH-、-N(CH₂CH₂C₆H₅)-、-C₃-C₇环烷基-CH₂-例如但不限于-环己基-CH₂-；

Z₂是键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH₃)-、-(CH₂)_n-、-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO₂-或-C(=NH)-、-CH₂NH(CO)-、-CH₂NH(CO)O-、-CH₂NH(CO)NH-、-(CH₂)_pNH(CO)-、-(CH₂)_pNH(CO)O-、-(CH₂)_pNH(CO)NH-；-C₃-C₇环烷基-NH(CO)-、-C₃-C₇环烷基-NCH₃(CO)-、-C₃-C₇环烷基-CH₂NH(CO)O-、-C₃-C₇环烷基-CH₂NCH₃(CO)O-、-C₃-C₇环烷基-NH(CO)NH-、-C₃-C₇环烷基-NCH₃(CO)NH-、-N(CH₂CH₂C₆H₅)-；或任选取代的C₆-C₁₂芳基；

Z₃是-OH、-OCH₃、-O-C₁-C₆烷基、-O-CH₂C₆H₅、-NH₂、-NH(C₁-C₆烷基)、-N(C₁-C₆烷基)

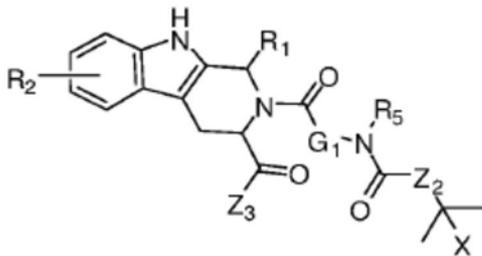
2、-C1-C6烷基；

R5是H、甲基或任选取代的C1-C6烷基；以及

R4是H、任选取代的C1-C9烷基例如但不限于叔丁基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C6-C12芳基例如但不限于任选取代的萘基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基；任选取代的C7-C15芳基烷基例如但不限于苄基或 α -甲基苄基；任选取代的C3-C7环烷基； $-(CH_2)_p-NH(CO)O-(C1-C6烷基)$ ； $-CH_2O(CH_2)_p-NH(CO)O-(C1-C6烷基)$ ； $-(CH_2)_p-NHCO-(CH_2)_n-NH(CO)O-C1-C6烷基$ ； $-NH(CO)O-叔丁基$ ；或 $-O-叔丁基$ ；其中， $m=1-5$ ； $n=1-8$ ； $p=1-9$ ；

其中，“取代的”是指被独立地选自以下的一个或多个取代：卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基例如但不限于甲氧基、乙氧基、C1-C6烷基、-OH、-OCH₃、-OC₂H₅、-O-C1-C4烷基、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

38. 根据权利要求36所述的化合物，其中，所述化合物具有式4：



其中，

R1是H、任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C1-C6烷氧基；任选取代的C6-C12芳基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基；任选取代的C7-C15芳基烷基例如但不限于苄基或 α -甲基苄基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C2-C15杂芳基烷基；任选取代的C7-C15芳基烯基；任选取代的C3-C8环烷基；或任选取代的C4-C8环烷基烷基；

R2是氢、C1-C6烷氧基例如但不限于甲氧基或乙氧基、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H；

G1是键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH₃)-、 $-(CH_2)_n-$ 、-C3-C7环烷基、-C3-C7环烷基-CH₂-、-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO₂-或-C(=NH)-、-CH₂NH(CO)-、-CH₂NH(CO)O-、-CH₂NH(CO)NH-、 $-(CH_2)_nNH(CO)-$ 、 $-(CH_2)_nNH(CO)O-$ 、 $-(CH_2)_mNH(CO)NH-$ ；-C3-C7环烷基-NH(CO)-、-C3-C7环烷基-CH₂NH(CO)O-、-C3-C7环烷基-NH(CO)NH-、-N(CH₂CH₂C₆H₅)-、-C3-C7环烷基-CH₂-例如但不限于-环己基-CH₂-；

Z2是键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH₃)-、 $-(CH_2)_n-$ ；-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO₂-或-C(=NH)-、-CH₂NH(CO)-、-CH₂NH(CO)O-、-CH₂NH(CO)NH-； $-(CH_2)_pNH(CO)-$ 、 $-(CH_2)_pNH(CO)O-$ 、 $-(CH_2)_pNH(CO)NH-$ ；-C3-C7环烷基-NH(CO)-、-C3-C7环烷基-CH₂NH(CO)O-、-C3-C7环烷基-NH(CO)NH-或-N(CH₂CH₂C₆H₅)-；

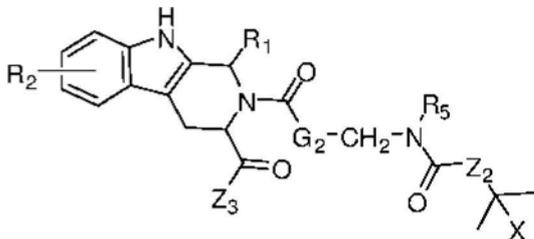
Z3是-OH、-OCH₃、-O-C1-C6烷基、-OCH₂C₆H₅、-NH₂、-NH(C1-C6烷基)、-N(C1-C6烷基)₂、-C1-C6烷基；

R5是H、甲基或任选取代的C1-C6烷基；以及

X是H、C1-C3烷基或C1-C3芳基烷基；其中， $m=1-5$ ； $n=1-8$ ； $p=1-9$ ；

其中，“取代的”是指被独立地选自以下的一个或多个取代：卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-OCH₃、-OC₂H₅、-O-C1-C4烷基、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

39. 根据权利要求38所述的化合物，其中，所述化合物具有式5：



其中，

R1是H、任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C1-C6烷氧基；任选取代的C6-C12芳基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基；任选取代的C7-C15芳基烷基例如但不限于苄基或 α -甲基苄基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C2-C15杂芳基烷基；任选取代的芳基烯基；任选取代的C3-C8环烷基；或任选取代的C4-C8环烷基烷基；

R2是氢、C1-C6烷氧基例如但不限于甲氧基或乙氧基、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H；

G2是键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH₃)-、-(CH₂)_n-、-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO₂-或-C(=NH)-、-CH₂NH(CO)-、-CH₂NH(CO)O-、-CH₂NH(CO)NH-；-(CH₂)_nNH(CO)-、-(CH₂)_nNH(CO)O-、-(CH₂)_mNH(CO)NH-；-C3-C7环烷基例如但不限于-环己基-、或-N(CH₂CH₂C₆H₅)-；

Z2是键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH₃)-、-(CH₂)_n-、-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO₂-或-C(=NH)-、-CH₂NH(CO)-、-CH₂NH(CO)O-、-CH₂NH(CO)NH-；-(CH₂)_pNH(CO)-、-(CH₂)_pNH(CO)O-、-(CH₂)_pNH(CO)NH-；-C3-C7环烷基-NH(CO)-、-C3-C7环烷基-CH₂NH(CO)O-、-C3-C7环烷基-NH(CO)NH-或-N(CH₂CH₂C₆H₅)-；

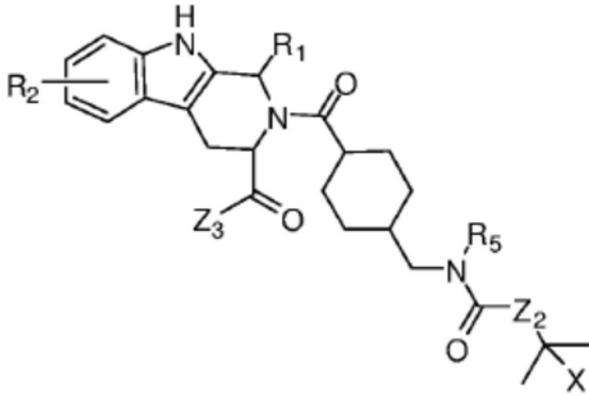
Z3是-OH、-OCH₃、-O-C1-C6烷基、-OCH₂C₆H₅、-NH₂、-NH(C1-C6烷基)、-N(C1-C6烷基)₂、-C1-C6烷基；

R5是H、甲基或任选取代的C1-C6烷基；以及

X是H、C1-C3烷基或C1-C3芳基烷基；其中， $m=1-5$ ； $n=1-8$ ； $p=1-9$ ；

其中，“取代的”是指被独立地选自以下的一个或多个取代：卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-OCH₃、-OC₂H₅、-O-C1-C4烷基、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

40. 根据权利要求39所述的化合物，其中，所述化合物具有式6：



其中，

R1是H、任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C1-C6烷氧基；任选取代的C6-C12芳基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基；任选取代的C7-C15芳基烷基例如但不限于苄基或 α -甲基苄基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C2-C15杂芳基烷基；任选取代的C7-C15芳基烯基；任选取代的C3-C8环烷基；或任选取代的C4-C8环烷基烷基；

R2是氢、C1-C6烷氧基例如但不限于甲氧基或乙氧基、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H；

R5是H、甲基或任选取代的C1-C6烷基；

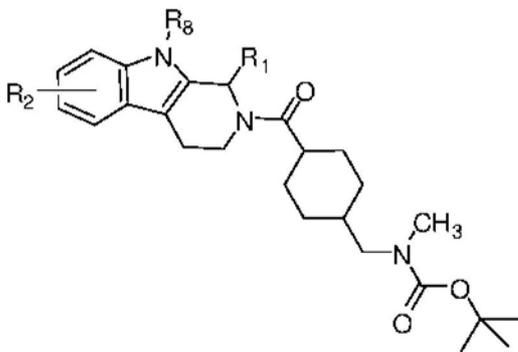
X是H、C1-C3烷基或C1-C3芳基烷基；

Z2是键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH₃)-、-(CH₂)_n-；-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO₂-、-C(=NH)-、-CH₂NH(CO)-、-CH₂NH(CO)O-、-CH₂NH(CO)NH-；-(CH₂)_nNH(CO)-、-(CH₂)_nNH(CO)O-、-(CH₂)_mNH(CO)NH-；-C3-C7环烷基-NH(CO)-、-C3-C7环烷基-CH₂NH(CO)O-、-C3-C7环烷基-NH(CO)NH-或-N(CH₂CH₂C₆H₅)-；以及

Z3是-OH、-OCH₃、-O-C1-C6烷基、-OCH₂C₆H₅、-NH₂、-NH(C1-C6烷基)、-N(C1-C6烷基)₂、-C1-C6烷基；其中，m=1-5；n=1-8；

其中，“取代的”是指被独立地选自以下的一个或多个取代：卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-OCH₃、-OC₂H₅、-O-C1-C4烷基、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

41. 具有式7的化合物：



其中，

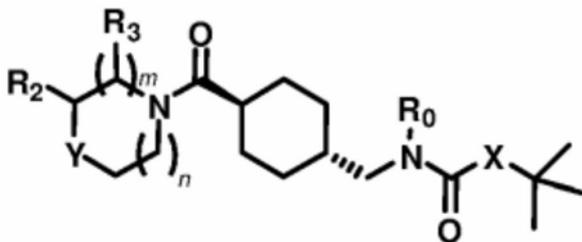
R1是H、任选取代的C1-C6烷基；C3-C4环烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C1-C6烷氧基；任选取代的C6-C12芳基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基；任选取代的C7-C15芳基烷基例如但不限于苄基或 α -甲基苄基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C2-C15杂芳基烷基；任选取代的C7-C15芳基烯基；任选取代的C3-C8环烷基；或任选取代的C4-C8环烷基烷基；

R2是氢、C1-C6烷氧基例如但不限于甲氧基或乙氧基、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H；以及

R8是H、任选取代的C1-C6烷基；C3-C4环烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C1-C6烷氧基；任选取代的C6-C12芳基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基；任选取代的C7-C15芳基烷基例如但不限于苄基或 α -甲基苄基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C2-C15杂芳基烷基；任选取代的C7-C15芳基烯基；任选取代的C3-C8环烷基；或任选取代的C4-C8环烷基烷基；

其中，“取代的”是指被独立地选自以下的一个或多个取代：卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-OCH₃、-OC₂H₅、-O-C1-C4烷基、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

42. 具有式8的化合物：



其中，

X是O、NH、S或CH₂；

Y是O、N-R1、N-CH₂-R1、CH-R1或CH-CH₂-R1；

R0是H或C1-C5烷基

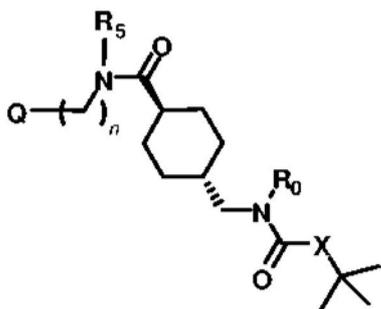
R1是H、C1-5烷基、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基；

R2是H或任选取代的芳基；以及

R3是H或C1-3烷基；其中，m是0或1；以及n是0或1，

其中，“取代的”是指被独立地选自以下的一个或多个取代：卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-OCH₃、-OC₂H₅、-O-C1-C4烷基、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

43. 具有式9的化合物：



其中，

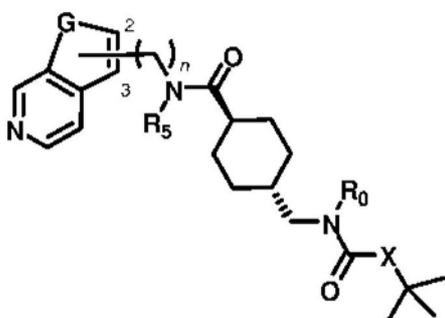
Q是杂芳基；

R0是H或C1-4烷基；

X是O、NH或CH2；

R5是H或CH3；以及n是1、2或3。

44. 具有式10的化合物：



其中，

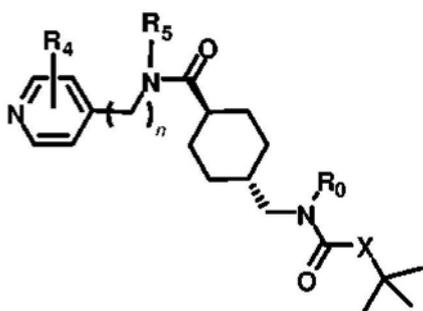
R0是H或C1-4烷基；

X是O、NH或CH2；

R5是H或C1-4烷基；以及

G是NH、-CH=CH-、O或S；以及n是1或2。

45. 根据权利要求43所述的化合物，其中，所述化合物具有式11：



其中，

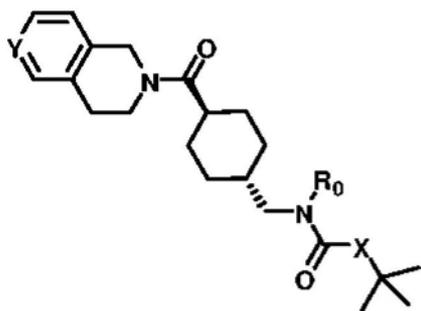
R0是H或C1-4烷基；

X是O、CH2或NH；

R4是H、CH3、OH、NH2；以及

R5是H或C1-4烷基；以及n是1-3。

46. 具有式12的化合物：



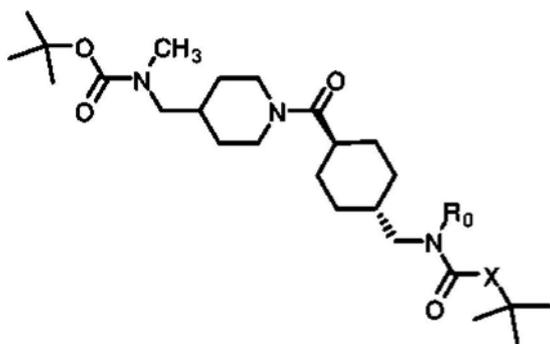
其中，

R0是H或C1-4烷基；

X为O、NH或CH₂；以及

Y是N或CH。

47. 具有式13的化合物：

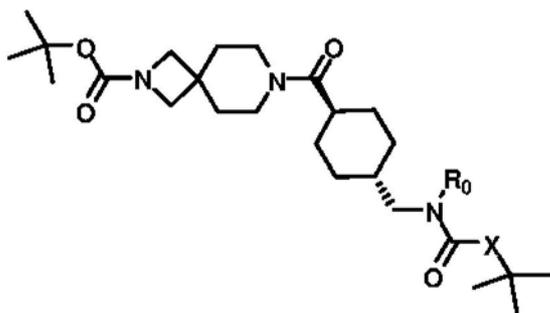


其中，

R0是H或C1-4烷基；以及

X是O、NH或CH₂。

48. 具有式14的化合物：

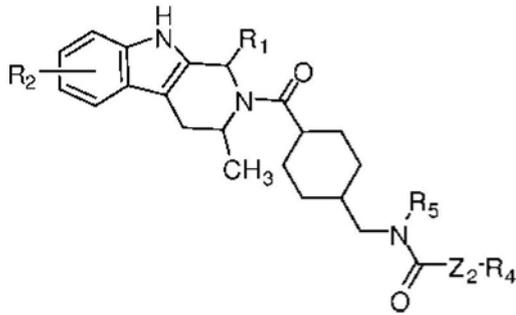


其中，

R0是H或C1-4烷基；以及

X是O、NH或CH₂。

49. 具有式15的化合物：



其中，

R1是H、任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C1-C6烷氧基；任选取代的C6-C12芳基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基；任选取代的C7-C15芳基烷基例如但不限于苄基或 α -甲基苄基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C2-C15杂芳基烷基；任选取代的C7-C15芳基烯基；任选取代的C3-C8环烷基；或任选取代的C4-C8环烷基烷基；

R2是氢、C1-C6烷氧基例如但不限于甲氧基或乙氧基、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H；

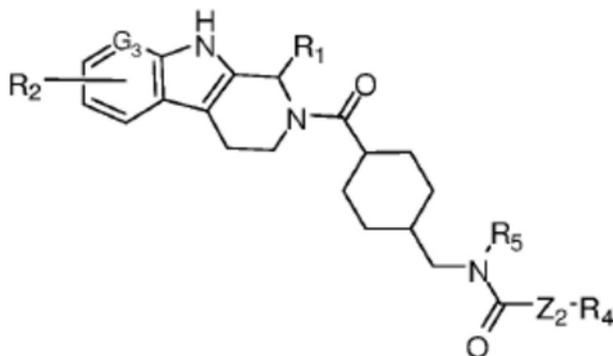
R5是H、甲基、乙基、C1-C6烷基、C1-C3芳基烷基或2-苯乙基；

Z2是键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH₃)-、-CH₂-、-(CH₂)_n-、-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO₂-、-C(=NH)-、-CH₂NH(CO)-、-CH₂NH(CO)O-、-CH₂NH(CO)NH-；-(CH₂)_nNH(CO)-、-(CH₂)_nNH(CO)O-、-(CH₂)_mNH(CO)NH-；以及

R4是H、任选取代的C1-C9烷基例如但不限于叔丁基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C6-C12芳基例如但不限于任选取代的苯基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基；任选取代的C7-C15芳基烷基例如但不限于苄基或 α -甲基苄基；-O-叔丁基；其中，m=1-5；n=1-8；

其中，“取代的”是指被独立地选自以下的一个或多个取代：卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

50. 具有式16的化合物：



其中，

G3是CH或N；

R1是H、任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C1-C6烷氧基；任选

取代的C6-C12芳基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基；任选取代的C7-C15芳基烷基例如但不限于苄基或 α -甲基苄基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C2-C15杂芳基烷基；任选取代的C7-C15芳基烯基；任选取代的C3-C8环烷基；或任选取代的C4-C8环烷基烷基；

R2是氢、C1-C6烷氧基例如但不限于甲氧基或乙氧基、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H；

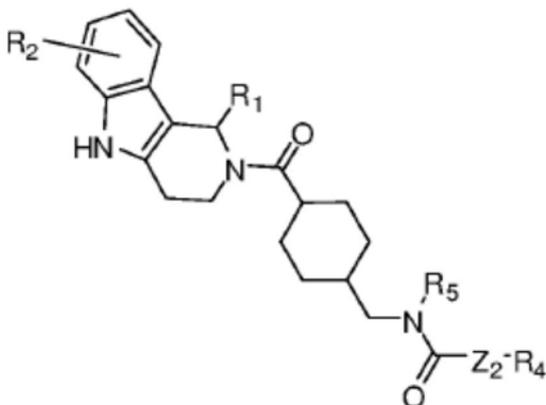
R5是甲基、乙基、C1-C6烷基、C1-C3芳基烷基或2-苯乙基；

Z2是键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH₃)-、-CH₂-、-(CH₂)_n-、-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO₂-、-C(=NH)-、-CH₂NH(CO)-、-CH₂NH(CO)O-、-CH₂NH(CO)NH-；-(CH₂)_nNH(CO)-、-(CH₂)_nNH(CO)O-、-(CH₂)_mNH(CO)NH-；以及

R4是H、任选取代的C1-C9烷基例如但不限于叔丁基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C6-C12芳基例如但不限于任选取代的苯基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基；任选取代的C7-C15芳基烷基例如但不限于苄基或 α -甲基苄基；-O-叔丁基；m=1-5；n=1-8；

其中，“取代的”是指被独立地选自以下的一个或多个取代：卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

51. 具有式17的化合物：



其中，

R1是H、任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C1-C6烷氧基；任选取代的C6-C12芳基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基；任选取代的C7-C15芳基烷基例如但不限于苄基或 α -甲基苄基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C2-C15杂芳基烷基；任选取代的C7-C15芳基烯基；任选取代的C3-C8环烷基；或任选取代的C4-C8环烷基烷基；

R2是氢、C1-C6烷氧基例如但不限于甲氧基或乙氧基、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H；

R5是H、甲基、乙基、C1-C6烷基、C1-C3芳基烷基或2-苯乙基；

Z2是键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH₃)-、-CH₂-、-(CH₂)_n-、-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO₂-、-C(=

NH)-、-CH₂NH(CO)-、-CH₂NH(CO)O-、-CH₂NH(CO)NH-;-(CH₂)_nNH(CO)-、-(CH₂)_nNH(CO)O-、-(CH₂)_mNH(CO)NH-;以及

R₄是H、任选取代的C₁-C₉烷基例如但不限于叔丁基;任选取代的C₂-C₆烯基;任选取代的C₆-C₁₂芳基例如但不限于任选取代的苯基;具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C₁-C₉杂芳基;任选取代的C₇-C₁₅芳基烷基例如但不限于苄基或α-甲基苄基;-O-叔丁基;m=1-5;n=1-8;

其中,“取代的”是指被独立地选自以下的一个或多个取代:卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C₁-C₆烷氧基、C₁-C₆烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

52. 一种治疗受试者的癌症的方法,其包括向受试者给予式1至17的化合物或如图18A-18E所示的化合物或本说明书中在第48-64页或约第48-64页所绘出的化合物。

53. 根据权利要求52所述的方法,其中化合物是如在本说明书中第48-64页或大约48-64页所绘出的任何化合物。

54. 根据权利要求52所述的方法,其中所述癌症是MUC1阳性或MUC1*阳性癌症。

55. 根据权利要求52所述的方法,其中所述癌症是NME7_{AB}或NME7-X1阳性癌症。

56. 一种预防或治疗癌症或癌症转移的方法,包括以下步骤:

(i) 分析来自患者的癌性样品并确定其为MUC1*阳性、NME7_{AB}阳性或NME7-X1阳性;和

(ii) 向患者给予有效量的式1至17的化合物。

57. 根据权利要求56所述的方法,其中,所述分析步骤通过PCR进行。

58. 根据权利要求56所述的方法,其中,当所述癌性样品表达MUC1基因、NME7基因或NME7-X1基因的mRNA水平为EEF1A1基因的mRNA表达水平的至少0.5%时,确定为MUC1*阳性、NME7_{AB}阳性或NME7-X1阳性。

59. 根据权利要求56所述的方法,其中,所述分析步骤通过免疫组织化学进行。

60. 根据权利要求56所述的方法,其中,当癌性样品与结合PSMGFR肽或N-10肽的抗体接触,并染色组织而病理学家标准评分为1-4(“+----”)时,其确定为MUC1*阳性。

61. 根据权利要求59所述的方法,其中,当所述癌性样品与结合NME7的B3肽的抗体接触,并染色组织而病理学家标准评分1-4(“+----”)时,其确定为NME7_{AB}阳性或NME7-X1阳性。

62. 一种鉴定用于预防或治疗炎性疾病或病症的药剂的方法,其包括以下步骤:

(i) 将干细胞暴露于药剂中,和

(ii) 鉴定抑制干细胞多能性或生长、或诱导干细胞分化的药剂,其中该药剂或其类似物是用于治疗炎症疾病或病症的药剂。

63. 根据权利要求62所述的方法,其中所述炎性疾病或病症是类风湿关节炎、炎性肠综合征、Crohn病、骨关节炎、哮喘、皮炎、牛皮癣、囊性纤维化、移植后迟发和慢性实体器官排斥反应、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、Sjogren综合征、Hashimoto甲状腺炎、多发性肌炎、硬皮病、Addison病、白癜风、恶性贫血、肾小球肾炎、肺纤维化、自身免疫性糖尿病、糖尿病视网膜膜病变、鼻炎、缺血再灌注损伤、血管成形术后再狭窄、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、Graves病、胃肠道过敏、结膜炎、动脉粥样硬化、冠状动脉疾病、心绞痛、癌症转移、小动脉疾病或线粒体疾病。

64. 一种治疗炎症疾病或病症的方法,包括向有需要的人给予在与干细胞接触时抑制干细胞多能性或生长或诱导干细胞分化的药剂。

65. 根据权利要求64所述的方法,其中所述炎性疾病或病症是类风湿关节炎、炎性肠综合征、Crohn病、骨关节炎、哮喘、皮炎、牛皮癣、囊性纤维化、移植后迟发和慢性实体器官排斥反应、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、Sjogren综合征、Hashimoto甲状腺炎、多发性肌炎、硬皮病、Addison病、白癜风、恶性贫血、肾小球肾炎、肺纤维化、自身免疫性糖尿病、糖尿病视网膜膜病变、鼻炎、缺血再灌注损伤、血管成形术后再狭窄、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、Graves病、胃肠道过敏、结膜炎、动脉粥样硬化、冠状动脉疾病、心绞痛、癌症转移、小动脉疾病或线粒体疾病。

66. 根据权利要求64所述的方法,其中所述药剂是式1至17的化合物,或如图18A-18E所示,或在本说明书中第48-64页或大约48-64所绘出的化合物。

67. 一种治疗诊断为患有癌症或有风险发展癌症的患者的方法,包括:

- (i) 在化合物存在下培养幼稚干细胞和成纤维细胞;
- (ii) 观察到化合物抑制了幼稚干细胞的生长或多能性;
- (iii) 观察到所述化合物对成纤维细胞几乎没有或没有影响;
- (iv) 得出结论,所述化合物将抑制癌细胞的生长或侵袭性;和
- (v) 向患者给予有效量的化合物以治疗或预防转移。

分化干细胞和治疗癌症的药剂

技术领域

本发明一般涉及用于治疗癌症的方法和组合物,以所述化合物具有区分干细胞的功能为特点。

背景技术

最近发现,在标准条件下培养的人干细胞并非处于真正的多能状态。相反,它们经历了一些分化,并做出了某些细胞命运决定,这一点可以通过各种甲基化标记的积累来证明。当将人培养的干细胞与小鼠胚胎的细胞进行比较时,可以确定人培养的干细胞的外观和行为更像是来自胚胎的外胚层部分的小鼠干细胞,其已经开始分化,而不是内细胞团的真正多能干细胞。研究人员称内细胞团的真正多能干细胞为“幼稚”,称分化程度更高的细胞为“始发”。进一步的研究表明,小鼠和人始发状态干细胞均通过在bFGF中培养而自我复制,而小鼠幼稚干细胞通过在LIF中进行培养而自我复制。使人干细胞在幼稚状态下生长的生长因子尚不清楚。始发状态干细胞易于自发分化,必须手动切割以去除分化部分,而幼稚干细胞自然会抵抗自发分化。另外,始发干细胞不能作为单细胞通过,克隆效率非常低,而幼稚干细胞可以作为单细胞通过,克隆效率很高。女性幼稚干细胞有两个活跃的X染色体,而始发状态干细胞已经通过甲基化使一个X染色体失活。另外,现在已知,幼稚状态干细胞有更少的甲基化标记,这基本上是早期分化决定,也称为细胞命运决定,其限制了干细胞可以变成的成熟细胞的类型。

发明内容

在本发明的一个方面,公开了一种药物筛选,其中筛选药剂相比始发干细胞优先抑制幼稚干细胞的多能性的能力。筛选的药剂可以是抗体或抗体样分子、多克隆、单克隆、抗体片段融合蛋白、抗体模拟物、肽或肽模拟物、小分子或天然产物。

在本发明的另一方面,公开了抑制癌症生长、抑制转移性癌细胞的生长或抑制癌细胞的转移潜力的药物,其中通过其诱导分化幼稚干细胞或抑制幼稚干细胞的多能性的能力及其诱导分化始发干细胞或抑制始发干细胞的多能性的相对无能,来鉴定所述药剂。

在本发明的又一个方面,公开了所公开的药剂,用作治疗或预防癌症的抗癌或抗转移治疗剂。

在本发明的另一方面,通过鉴定在幼稚干细胞中而不在始发干细胞中上调的基因来鉴定新颖的抗癌或抗转移性药物靶标。

在本发明的又一个方面,通过鉴定在幼稚干细胞中而不在始发干细胞中上调的微RNA,鉴定了新颖的抗癌或抗转移性药物靶标。

一方面,本发明涉及鉴定用于治疗或预防癌症或转移性癌症的药剂的方法,其包括以下步骤:

(i) 使干细胞与潜在药剂接触,和(ii) 鉴定诱导分化或抑制干细胞多能性或干细胞生长的药剂,其中该药剂被确定为抗癌剂。干细胞可以是幼稚状态干细胞。或者,在步骤(i)

中,干细胞可以是幼稚状态或始发状态干细胞,其中将药剂对幼稚状态干细胞的效果与对始发状态干细胞的效果进行比较,其中如果与始发状态干细胞相比药剂对幼稚状态干细胞具有更明显的作用,则该药物被确定为抗癌剂。该药剂可以是多克隆抗体、单克隆抗体、抗体样分子、抗体片段融合蛋白、抗体模拟物、肽、肽模拟物、小分子或天然产物。干细胞可以是人的。通过在包含NME7_{AB}或NME7-X1的培养基中培养,可以将干细胞保持为幼稚状态。癌症可能是乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、前列腺癌、结肠癌、肺癌或胰腺癌。癌症可以是MUC1阳性或MUC1*阳性癌症。癌症可以是NME7_{AB}或NME7-X1阳性癌症。该药剂通常可能没有细胞毒性。该药剂可能对成纤维细胞或成纤维祖细胞没有细胞毒性。

在另一方面,本发明涉及一种预防或治疗癌症的方法,该方法包括向受试者给予通过上述方法获得的药剂。癌症可能是乳腺癌、卵巢癌、黑色素瘤、前列腺癌、结肠癌、肺癌或胰腺癌。该癌症可以是MUC1阳性或MUC1*阳性癌症。该癌症可以是NME7_{AB}或NME7-X1阳性癌症。

在另一方面,本发明涉及一种预防癌症转移的方法,该方法包括向受试者给予通过上述方法获得的药剂。

在另一方面,本发明涉及抑制癌症生长、迁移或侵袭性的方法,该方法包括向受试者施用通过根据上述方法获得的药剂。

另一方面,本发明涉及抑制转移性癌细胞生长的方法,该方法包括向受试者给予根据上述方法获得的药剂。

在另一方面,本发明涉及鉴定用于药物发现的抗癌或抗转移靶标的方法,其包括鉴定与始发状态干细胞相比在幼稚状态干细胞中上调的基因或基因产物。

在另一方面,本发明涉及鉴定用于药物发现的抗癌或抗转移靶标的方法,其包括鉴定与始发状态干细胞相比在幼稚状态干细胞中下调的基因或基因产物。

在另一方面,本发明涉及鉴定抗癌或抗转移药剂的方法,该方法包括:(i)鉴定与始发状态干细胞相比,在幼稚状态干细胞中下调的基因或基因产物;(ii)使幼稚干细胞与药剂接触;(iii)鉴定增加在幼稚状态干细胞中下调的基因或基因产物的表达或活性的药剂。下调的基因可以是当干细胞开始分化时上调的基因。下调的基因可能是纤连蛋白、波形蛋白或NF1。

在另一方面,本发明涉及鉴定抗癌或抗转移药剂的方法,该方法包括:(i)鉴定与始发状态干细胞相比,在幼稚状态干细胞中上调的基因或基因产物;(ii)使幼稚干细胞与药剂接触;(iii)鉴定抑制在幼稚状态干细胞中上调的基因或基因产物的表达或活性的药剂。上调的基因可以是E-钙粘着蛋白、CXCR4、 β -连环蛋白、AXIN2、MUC1、NME7或NME7-X1。

另一方面,本发明涉及鉴定抗癌或抗转移药剂的方法,该方法包括:(i)鉴定与成纤维细胞相比,在幼稚状态干细胞中上调的基因或基因产物;(ii)使幼稚干细胞与药剂接触;(iii)鉴定抑制在幼稚状态干细胞中上调的基因或基因产物的表达或活性的药剂。上调的基因可以是E-钙粘着蛋白、CXCR4、 β -连环蛋白、AXIN2、MUC1、NME7或NME7-X1。

在另一方面,本发明涉及鉴定抗癌或抗转移药剂的方法,其包括:(i)鉴定与成纤维细胞相比,在幼稚状态干细胞中下调的基因或基因产物;(ii)使幼稚干细胞与药剂接触;(iii)鉴定增加在幼稚状态干细胞中下调的基因或基因产物的表达或活性的药剂。下调的基因可以是当干细胞开始分化时上调的基因。下调的基因可以是纤连蛋白、波形蛋白、NF1或微RNA-145。下调的基因可以是超级增强子靶基因,例如HES3、GNAS、VLDLR、EXT1、FBXL17、

RHOC或GREB 1L。

在另一方面,本发明涉及鉴定抗癌或抗转移药剂的方法,其包括:(i) 鉴定与始发干细胞或成纤维细胞相比,在幼稚状态干细胞中上调的微RNA;(ii) 使幼稚干细胞与药剂接触;(iii) 鉴定抑制在幼稚状态干细胞中上调的微RNA的表达或活性的药剂。

在另一方面,本发明涉及式1至17的化合物。

在另一方面,本发明涉及治疗受试者的癌症的方法,其包括向受试者给予式1至17的化合物或如图18A-18E所示的化合物或如本发明在第48-64页或约第48-64页所绘出的化合物。所述癌症可以是MUC1阳性或MUC1*阳性或MUC1阴性癌症。该癌症可以是NME7_{AB}或NME7-X1阳性癌症。

在另一方面,本发明涉及用于预防或治疗癌症或癌症转移的方法,其包括以下步骤:(i) 分析来自患者的癌性样品并确定其为MUC1*阳性、NME7_{AB}阳性或NME7-X1阳性;和

(ii) 向患者给予有效量的式1至17的化合物。分析步骤可以通过PCR进行。在一方面,当癌性样品可以表达MUC1基因、NME7基因或NME7-X1基因的mRNA水平为EEF1A1基因的mRNA表达水平的至少0.5%时,确定为MUC1*阳性、NME7_{AB}阳性或NME7-X1阳性。分析步骤可以通过免疫组织化学进行。一方面,当癌性样品可以与结合PSMGFR肽或N-10肽的抗体接触,并染色组织而病理学家标准评分为1-4(“+----”)时,其确定为MUC1*阳性。当癌性样品可以与结合NME7的B3肽的抗体接触,并染色组织而病理学家标准评分为1-4(“+----”)时,其确定为NME7_{AB}阳性或NME7-X1阳性。

在另一方面,本发明涉及鉴定用于预防或治疗炎性疾病或病症的药剂的方法,其包括以下步骤:(i) 将干细胞暴露于药剂,和(ii) 鉴定抑制干细胞多能性或生长、或诱导干细胞分化的药剂,其中该药剂或其类似物是用于治疗炎性疾病或病症的药剂。炎性疾病或病症可能是类风湿关节炎、炎性肠综合征、Crohn病、骨关节炎、哮喘、皮炎、牛皮癣、囊性纤维化、移植后迟发和慢性实体器官排斥反应、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、Sjogren综合征、Hashimoto甲状腺炎、多发性肌炎、硬皮病、Addison病、白癜风、恶性贫血、肾小球肾炎、肺纤维化、自身免疫性糖尿病、糖尿病视网膜病变、鼻炎、缺血再灌注损伤、血管成形术后再狭窄、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、Graves病、胃肠道过敏、结膜炎、动脉粥样硬化、冠状动脉疾病、心绞痛、癌症转移、小动脉疾病或线粒体疾病。

另一方面,本发明涉及治疗炎性疾病或病症的方法,该方法包括向有需要的人给予在与干细胞接触时抑制干细胞多能性或生长、或诱导干细胞分化的药剂。炎性疾病或病症可能是类风湿关节炎、炎性肠综合征、Crohn病、骨关节炎、哮喘、皮炎、牛皮癣、囊性纤维化、移植后迟发和慢性实体器官排斥反应、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、Sjogren综合征、Hashimoto甲状腺炎、多发性肌炎、硬皮病、Addison病、白癜风、恶性贫血、肾小球肾炎、肺纤维化、自身免疫性糖尿病、糖尿病视网膜病变、鼻炎、缺血再灌注损伤、血管成形术后再狭窄、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、Graves病、胃肠道过敏、结膜炎、动脉粥样硬化、冠状动脉疾病、心绞痛、癌症转移、小动脉疾病或线粒体疾病。该药剂可以是式1至17的化合物、或如图18A-18E所示的化合物、或在本说明书中第48-64页或约48-64页所示的化合物。

从以下对本发明的描述、所附的附图和所附的权利要求书,将更充分地理解本发明的这些和其他目的。

附图说明

从以下给出的详细描述和附图,将更加充分地理解本发明,所述附图仅以示例的方式给出,因此不构成对本发明的限制,并且其中;

图1显示了一组小分子的化学结构,已经测试这些小分子的抑制幼稚状态或始发状态干细胞的多能性、生长、或诱导幼稚状态或始发状态干细胞分化的能力。

图2是总结小分子、抗MUC1*Fab“E6”、MUC1*细胞外域肽“FLR”和抗NME7抗体#56和#61的测试结果的表。

图3A-3L显示了放大10倍的人始发状态干细胞的照片,该细胞在具有生长因子FGF的干细胞培养基中、MEF层上生长,并在测试药剂的存在下处理3天。图3A显示了在名为E6的抗MUC1*Fab存在下培养的始发干细胞的照片,图3B显示了在MUC1*胞外域肽FLR存在下培养的始发干细胞的照片,图3C显示了对照始发干细胞的照片,图3D示出了在0.2%DMSO中培养的干细胞的照片,其作为在0.2%DMSO中的小分子对照。图3E显示了在MN0642存在下培养的始发干细胞的照片,图3F显示了在MN1130存在下培养的始发干细胞的照片,图3G显示了在MN0572存在下培养的始发干细胞的照片,图3H显示了在MN0947存在下培养的始发干细胞的照片,图3I显示了在MN0129存在下培养的始发干细胞的照片,图3J显示了在MN0676存在下培养的始发干细胞的照片,图3K显示了在MN0992存在下培养的始发干细胞的照片,图3L显示了在MN0402存在下培养的始发干细胞的照片。

图4A-4L显示了放大20倍的人始发状态干细胞的照片,该细胞在具有生长因子FGF的干细胞培养基中、MEF层上生长,并在测试药剂的存在下处理3天。虚线表示抑制干细胞多能性或生长、或诱导分化的区域。图4A显示了在名为E6的抗MUC1*Fab存在下培养的始发干细胞的照片,图4B显示了在MUC1*_{ecd}肽胞外域肽(也称为FLR)的存在下培养的始发干细胞的照片,图4C显示了对照始发干细胞的照片,图4D显示了在0.2%DMSO中培养的始发干细胞的照片,其作为在0.2%DMSO中的小分子的对照,图4E显示了在MN0642存在下培养的始发干细胞的照片,图4F显示了在MN1130存在下培养的始发干细胞的照片,图4G显示了在MN0572存在下培养的始发干细胞的照片,图4H显示了在MN0947存在下培养的始发干细胞的照片,图4I显示了在MN0129存在下培养的始发干细胞的照片,图4J显示了在MN0676存在下培养的始发干细胞的照片,图4K显示了在MN0992存在下培养的始发干细胞的照片,图3L显示了在MN0402存在下培养的始发干细胞的照片。

图5A-5L显示了放大10倍的人始发状态干细胞的照片,该细胞在没有生长因子FGF的干细胞培养基中、MEF层上生长,并在测试药剂的存在下处理3天。图5A显示了在名为E6的抗MUC1*Fab存在下培养的始发干细胞的照片,图5B显示了在MUC1*胞外域肽FLR存在下培养的始发干细胞的照片,图5C显示了在抗NME7多克隆抗体#56存在下培养的始发干细胞的照片,图5D显示在抗NME7多克隆抗体#61存在下培养的始发干细胞的照片,图5E显示在MN0642的存在下培养的始发干细胞的照片,图5F显示在MN1130存在下培养的始发干细胞的照片,图5G显示在MN0572存在下培养的始发干细胞的照片,图5H显示在MN0947存在下培养的始发干细胞的照片,图5I显示在MN0129的存在下培养的始发干细胞的照片,图5J显示在MN0676的存在下培养的始发干细胞的照片,图5K显示在MN0992的存在下培养的始发干细胞的照片,图5L显示了在MN0402存在下培养的始发干细胞的照片。

图6A-6L显示了放大20倍的人始发状态干细胞的照片,该细胞在没有生长因子FGF的干

细胞培养基中、MEF层上生长,并在测试药剂的存在下处理3天。虚线表示干抑制细胞多能性或生长、或诱导分化的区域。图6A显示了在名为E6的抗MUC1*Fab存在下培养的始发干细胞的照片,图6B显示了在MUC1*胞外域肽FLR存在下培养的始发干细胞的照片,图6C显示了在抗NME7多克隆抗体#56存在下培养的始发干细胞的照片,图6D显示在抗NME7多克隆抗体#61存在下培养的始发干细胞的照片,图6E显示在MN0642的存在下培养的始发干细胞的照片,图6F显示在MN1130存在下培养的始发干细胞的照片,图6G显示在MN0572存在下培养的始发的干细胞的照片,图6H显示在MN0947存在下培养的始发干细胞的照片,图6I显示在MN0129存在下培养的始发干细胞的照片,图6J显示在MN0676存在下培养的始发干细胞的照片,图6K显示在MN0992存在下培养的始发干细胞的照片,图6L显示了在MN0402存在下培养的始发干细胞的照片。

图7A-7L显示了放大10倍的人幼稚状态干细胞的照片,该细胞在具有生长因子NME7_{AB}的干细胞培养基中、MUC1*抗体C3表面上生长,并在测试药剂的存在下处理3天。虚线表示抑制干细胞多能性或生长、或诱导分化的区域。图7A显示了在命名为E6的抗MUC1*Fab存在下培养的幼稚干细胞的照片,图7B显示了在MUC1*胞外域肽FLR存在下培养的幼稚干细胞的照片,图7C显示了对照幼稚干细胞的照片,图7D显示了在0.2%DMSO中培养的幼稚干细胞的照片,作为在0.2%DMSO中的小分子的对照,图7E显示了在MN0642存在下培养的幼稚干细胞的照片,图7F显示了在MN1130存在下培养的幼稚干细胞的照片,图7G显示在MN0572存在下培养的幼稚干细胞的照片,图7H显示在MN0947存在下培养的幼稚干细胞的照片,图7I显示在MN0129存在下培养的幼稚干细胞的照片,图7J显示在MN0676存在下培养的幼稚干细胞的照片,图7K显示在MN0992存在下培养的幼稚干细胞的照片,图7L显示在MN0402存在下培养的幼稚干细胞的照片。

图8A-8L显示了放大20倍的人幼稚状态干细胞的照片,该细胞在具有生长因子NME7_{AB}的干细胞培养基中、在MUC1*抗体C3表面上生长,并在测试药剂的存在下处理3天。虚线表示抑制干细胞多能性或生长、或诱导分化的区域。图8A显示了在命名为E6的抗MUC1*Fab存在下培养的幼稚干细胞的照片,图8B显示了在MUC1*胞外结构域肽FLR存在下培养的幼稚干细胞的照片,图8C显示了对照幼稚干细胞的照片,图8D显示了在0.2%DMSO中培养的幼稚干细胞的照片,作为在0.2%DMSO中的小分子的对照,图8E显示了在MN0642存在下培养的幼稚干细胞的照片,图8F显示了在MN1130存在下培养的幼稚干细胞的照片,图8G显示在MN0572存在下培养的幼稚干细胞的照片,图8H显示在MN0947存在下培养的幼稚干细胞的照片,图8I显示在MN0129存在下培养的幼稚干细胞的照片,图8J显示在MN0676存在下培养的幼稚干细胞的照片,图8K显示在MN0992存在下培养的幼稚干细胞的照片,图8L显示在MN0402存在下培养的幼稚干细胞。

图9A-9L显示了放大10倍的人幼稚状态干细胞的照片,该细胞在不含生长因子NME7_{AB}的干细胞培养基中、在MUC1*抗体C3表面上生长,并在测试药剂的存在下处理了3天。虚线表示干细胞多能性或生长被抑制或诱导分化的区域。图9A显示了在命名为E6的抗MUC1*Fab存在下培养的幼稚干细胞的照片,图9B显示了在MUC1*胞外结构域肽FLR存在下培养的幼稚干细胞的照片,图9C显示了在抗NME7多克隆抗体#56存在下培养的幼稚干细胞的图,图9D显示在抗NME7多克隆抗体#61存在下培养的幼稚干细胞的图,图9E显示在MN0642存在下的幼稚干细胞的照片,图9F显示在MN1130存在下培养的幼稚干细胞的照片,图9G显示在MN0572存

在下培养的幼稚干细胞的照片,图9H显示在MN0947存在下培养的幼稚干细胞的照片,图9I显示了在MN0129存在下培养的幼稚干细胞的照片,图9J显示了在MN0676的存在下培养的幼稚干细胞的照片,图9K显示了在MN0992存在下培养的幼稚干细胞的照片,图9L显示在MN0402存在下培养的幼稚干细胞的照片。

图10A-10L显示了放大20倍的人幼稚状态干细胞的照片,该细胞在无NME7_{AB}的干细胞培养基中、在MUC1*抗体C3表面上生长,并在测试药剂的存在下处理3天。虚线表示抑制干细胞多能性或生长、或诱导分化的区域。图10A显示了在命名为E6的抗MUC1*Fab存在下培养的幼稚干细胞的照片,图10B显示了在MUC1*胞外结构域肽FLR存在下培养的幼稚干细胞的照片,图10C显示了在抗NME7多克隆抗体#56存在下培养的幼稚干细胞的照片,图10D显示在抗NME7多克隆抗体#61存在下培养的幼稚干细胞的照片,图10E显示在MN0642存在下培养的幼稚干细胞的照片,图10F显示在MN1130存在下培养的干细胞的照片,图10G显示在MN0572存在下培养的干细胞的照片,图10H显示在MN0947存在下培养的干细胞的照片,图10I显示了在MN0129存在下培养的幼稚干细胞的照片,图10J显示了在MN0676存在下培养的幼稚干细胞的照片,图10K显示了在MN0992存在下培养的幼稚干细胞的照片,图10L显示了在MN0402存在下培养的幼稚干细胞的照片。

图11A-11F显示了放大4倍的人始发状态干细胞的照片,该细胞先前在MEF上的bFGF中生长,但在实验过程中在不存在bFGF的条件下进行培养,并用测试药剂处理3天。虚线表示抑制干细胞多能性或生长、或诱导分化的区域。图11A显示在对照加扰序列siRNA存在下培养的始发干细胞的照片,图11B显示在BRD4特异性siRNA存在下培养的始发干细胞的照片,图11C显示在JMJD6特异性siRNA存在下培养的始发干细胞的照片,图11D显示在声称的BRD4抑制剂JQ1的无活性立体异构体又名JQ1-存在下培养的始发干细胞的照片,图11E显示在500nM的声称的BRD4抑制剂JQ1的活性立体异构体又名JQ1+存在下培养的始发干细胞的照片,图11F显示了在1 μ M的声称的BRD4抑制剂的活性立体异构体JQ1+存在下培养的始发干细胞的照片。

图12A-12F显示了放大20倍的人始发状态干细胞的照片,该细胞先前在bFGF中、MEF上生长,但在实验过程中在不存在bFGF的条件下培养,并用测试药剂处理3天。虚线表示抑制干细胞多能性或生长、或诱导分化的区域。图12A显示在对照加扰序列siRNA存在下培养的始发干细胞的照片,图12B显示在BRD4特异性siRNA存在下培养的始发干细胞的照片,图12C显示在JMJD6特异性siRNA存在下培养的始发干细胞的照片,图12D显示在声称的BRD4抑制剂的无活性立体异构体的JQ1又名JQ1-存在下培养的始发干细胞的照片,图12E显示在500nM的声称的BRD4抑制剂JQ1的活性立体异构体又名JQ1+存在下培养的始发的干细胞的照片,图12F显示了在1 μ M的声称的BRD4抑制剂的活性立体异构体JQ1+存在下培养的始发干细胞的照片。

图13A-13F显示了放大4倍的人幼稚状态干细胞的照片,该细胞先前在NME7_{AB}中、MUC1*抗体表面C3上生长,但在实验过程中在不存在NME7_{AB}的条件下培养,并用测试药剂处理3天。虚线表示抑制干细胞多能性或生长、或诱导分化的区域。图13A显示在对照加扰序列siRNA存在下培养的幼稚干细胞的照片,图13B显示在BRD4特异性siRNA存在下培养的幼稚干细胞的照片,图13C显示在JMJD6特异性siRNA存在下培养的幼稚干细胞的照片,图13D显示在声称的BRD4抑制剂JQ1的无活性立体异构体又名JQ1-存在下培养的幼稚干细胞的照片,图13E

显示在500nM的声称的BRD4抑制剂JQ1的活性立体异构体又名JQ1+存在下培养的幼稚干细胞的照片,图13F显示了在1 μ M的声称的BRD4抑制剂的活性立体异构体JQ1+存在下培养的幼稚干细胞的照片。

图14A-14F显示了放大20倍的人幼稚干细胞的照片,该细胞先前在NME7_{AB}中、MUC1*抗体表面C3上生长,但在实验过程中在不存在NME7_{AB}的条件下培养,并用测试药剂处理3天。虚线表示抑制干细胞多能性或生长、或诱导分化的区域。图14A显示了在对照加扰序列siRNA的存在下培养的幼稚干细胞的照片,图14B显示了在BRD4特异性siRNA的存在下培养的幼稚干细胞的照片,图14C显示了在JMJD6特异性siRNA的存在下培养的幼稚干细胞的照片,图14D显示在声称的BRD4抑制剂JQ1的无活性立体异构体又名JQ1-存在下培养的幼稚干细胞的照片,图14E显示在500nM的声称的BRD4抑制剂JQ1的活性立体异构体又名JQ1+存在下培养的幼稚干细胞的照片,图14F显示了在1 μ M的声称的BRD4抑制剂的活性立体异构体JQ1+存在下培养的幼稚干细胞的照片。

图15A-15F显示了放大4倍的人幼稚状态干细胞的照片,该细胞先前在NME1二聚体中、MUC1*抗体表面C3上生长,但在实验过程中在不存在NME7_{AB}的条件下培养,并用测试药剂处理3天。虚线表示抑制干细胞多能性或生长、或诱导分化的区域。图15A显示了在对照加扰序列siRNA存在下培养的幼稚干细胞的照片,图15B显示了在BRD4特异性siRNA存在下培养的幼稚干细胞的照片,图15C显示了在JMJD6特异性siRNA的存在下培养的幼稚干细胞的照片,图15D显示在声称的BRD4抑制剂JQ1的无活性立体异构体的又名JQ1-存在下培养的幼稚干细胞的照片,图15E显示在500nM的声称的BRD4抑制剂JQ1的活性立体异构体又名JQ1+存在下培养的幼稚干细胞的照片,图15F显示了在1 μ M的声称的BRD4抑制剂的活性立体异构体JQ1+存在下培养的幼稚干细胞的照片。

图16A-16F显示了放大20倍的人幼稚状态干细胞的照片,该细胞先前在NME1二聚体中、MUC1*抗体表面C3上生长,但在实验过程中在不存在NME1二聚体的条件下培养,并用测试药剂处理3天。虚线表示抑制干细胞多能性或生长、或诱导分化的区域。图16A显示在对照加扰序列siRNA的存在下培养的幼稚干细胞的照片,图16B显示在BRD4特异性siRNA的存在下培养的幼稚干细胞的照片,图16C显示在JMJD6特异性siRNA的存在下培养的幼稚干细胞的照片,图16D显示在声称的BRD4抑制剂的无活性立体异构体的JQ1又名JQ1-存在下培养的幼稚干细胞的照片,图16E显示在500nM的声称的BRD4抑制剂的活性立体异构体JQ1又名JQ1+存在下培养的幼稚干细胞的照片,图16F显示了在1 μ M的声称的BRD4抑制剂的活性立体异构体JQ1+存在下培养的幼稚干细胞的照片。

图17显示了先前报道的抑制癌细胞迁移的一些化合物以及发明人先前公开的一些化合物的化学结构。

图18A-18E显示了本发明化合物和各种其他先前已知的化学化合物的生物学数据的总结。

图19A-19P显示了用对照培养基或小分子培养3天的人干细胞的照片,该小分子先前已被报道抑制癌细胞迁移,癌细胞迁移是癌症转移的特征。在图19A-19H中,这些细胞是幼稚状态干细胞,先前在生长因子NME7_{AB}中、MUC1*抗体表面C3上生长,但在实验过程中在不存在NME7_{AB}的条件下进行培养。在图19I-19P中,这些细胞是始发状态干细胞,先前在生长因子FGF中、失活的MEF层上生长,但是在实验期间在不存在FGF的条件下进行培养。

图20是显示测得的癌细胞迁移抑制百分比的条形图。使用的癌细胞系是T47D乳腺癌细胞系。用胶原蛋白包被多孔板,并使用Platypus系统铺板细胞,该系统限制细胞进入孔中心直至细胞附着。使用图像J测量在126小时保持无细胞的面积百分数,并作图。测试的药剂是:抗MUC1*Fab“E6”,已显示在体外和体内抑制几乎所有测试的MUC1*阳性细胞的增殖;据报道,BRD4抑制剂JQ1在体内外抑制癌细胞的迁移和增殖;其他人报告的抑制一定范围癌细胞迁移的小分子;和本发明的新颖小分子。

图21A-21P显示了在126小时的癌细胞迁移测定的代表性照片,其中癌细胞用一组药剂处理。除非另有说明,否则小分子以终浓度6 μ M给予。“+”或“-”表示在幼稚/始发干细胞测定中每种药剂获得的分数。例如,+++/-表明该化合物深刻抑制了幼稚干细胞的多能性和增殖,但对始发干细胞没有影响。图21A用对照PBS处理细胞。图21B-21D用抗MUC1*Fab E6处理细胞。图21E-21I显示了在零时刻用对照量的DMSO处理的细胞。图21F-21G用JQ1处理细胞。图21H-21M显示了在126小时用对照量的DMSO处理的细胞。图21J显示了用新颖分子MN1194处理的细胞。图21K显示了用新颖分子MN1186处理的细胞。图21L显示了用新颖分子MN1137处理的细胞。图21N显示了用新颖分子MN1193处理的细胞。图21O显示了用新颖分子MN1203处理的细胞。图21P显示了用新颖分子MN1184处理的细胞。

图22A-22X显示了癌细胞迁移测定的结果,其中测试了抑制幼稚干细胞多能性或增殖的本发明新颖化合物抑制癌细胞侵袭或迁移的能力。图22A-22U显示了在120小时,在本发明的新颖化合物或对照(仅DMSO)存在下,对T47D乳腺癌细胞进行的迁移、侵袭测定的照片。图22V是显示对于多种化合物在0、24小时或48小时的时间测量的癌细胞迁移抑制的图。图22W是显示小分子的抑制作用随浓度变化的图,其中单位是 μ M。图22X是显示如何测量和计算本发明的小分子的IC50的图。

图23A-23D显示了培养中的人成纤维细胞的照片,仅用0.2%DMSO处理作为对照。

图24A-24F显示了JQ1+(图24A-24C)与非活性对映异构体JQ1-(图24D-24F)对人幼稚状态干细胞(图24A、24D)、人始发状态干细胞(图24B、24E)或人成纤维细胞(图24C、24F)的影响的照片。

图25A-25F显示了与先前已知的癌细胞迁移抑制剂相比,JQ1与本发明的化合物对人成纤维细胞祖细胞生长的影响的照片。

图26A-26H显示了干细胞对照实验和先前已知的化合物Dorsomorphin (Dorsomorphin)的照片。图26A-26B显示了在与溶解化合物相同浓度的DMSO中培养的始发状态干细胞。图26E-26F显示了在与溶解化合物相同浓度的DMSO中培养的幼稚状态干细胞。图26D显示了Dorsomorphin对始发状态干细胞的作用。图26G-26H显示了Dorsomorphin对幼稚状态干细胞的作用。

图27A-27F显示了人类幼稚状态干细胞的照片,其先前在NME7_{AB}中、MUC1*抗体表面C3上生长,但是在实验期间在不存在NME7_{AB}的情况下培养,并用终浓度为6 μ M的候选小分子药物处理了3天,除非另有说明。在每个组中,给出-或+、++、+++或++++的分数,其中“-”表示在指定的浓度下,候选药物对干细胞的多能性或增殖没有明显影响。“+”表示轻微的作用,“++++”表示对多能性或增殖的深远影响。增殖抑制可以看作是干细胞层中的孔或空白区域。多能性抑制,它也是分化的诱导,被认为是细胞大小的增加、细胞核大小的减少、细胞的伸长和变平、或细胞的圆化并漂浮在板上。

图27G-27L示出了人类始发状态干细胞的照片,该细胞先前在FGF中、MEF层上生长,但在实验过程中在不存在FGF的条件下培养,并用终浓度为6uM的候选小分子药物处理了3天,除非另有说明。在每个组中,给出-或+、++、+++或++++的评分,其中“-”表示在指定浓度下,候选药物对干细胞的多能性或增殖没有明显影响。“+”表示对多能性或增殖的轻微影响,“+++”表示对多能性或增殖的深远影响。始发状态干细胞生长为限定的集落,而不是像幼稚干细胞那样的均匀层。增殖抑制可以看作是集落尺寸的减小。多能性抑制,它也是分化的诱导,被认为是细胞大小的增加、细胞核大小的减少、细胞的伸长和变平、或细胞的圆化并漂浮在板上。

图28A-28L显示了在不同的人干细胞系上进行的对照实验的照片。图28A、28B、28E、28F显示了雌性诱导的多能干细胞系iPS 9X的照片,其处于幼稚状态,如第二个X染色体已被重新激活的文献所证明的。图28C、28D、28G、28H是在bFGF中生长的人类胚胎干细胞系HES-3,其使干细胞保持在始发状态。图28I-28L显示了人成纤维细胞(BJ品系,可从ATCC获得)的照片。

图29A-29F显示了人类幼稚状态干细胞的照片,其先前在NME7_{AB}中、MUC1*抗体表面C3上生长,但是在实验过程中在不存在NME7_{AB}的条件下培养,并用终浓度为6uM的候选小分子药物处理3天,除非另有说明。在每个组中,给出-或+、++、+++或++++的分数,其中“-”表示在指定的浓度下,候选药物对干细胞的多能性或增殖没有明显影响。“+”表示对多能性或增殖的轻微影响,“++++”表示对多能性或增殖的深远影响。增殖抑制可以看作是干细胞层中的孔或空白区域。多能性抑制,它也是分化的诱导,被认为是细胞大小的增加、细胞核大小的减少、细胞的伸长和变平、或细胞的圆化并漂浮在板上。

图29G-29L显示了人类始发状态干细胞的照片,该细胞先前在FGF中、MEF上生长,但在实验过程中在不存在FGF的条件下进行培养,除非另有说明,否则用终浓度为6uM的候选小分子药物处理3天。在每个组中,给出-或+、++、+++或++++的评分,其中“-”表示在指定浓度下,候选药物对干细胞的多能性或增殖没有明显影响。“+”表示多能性或增殖的轻微作用,“++++”表示对多能性或增殖的深远影响。始发状态干细胞生长为限定的集落,而不是像幼稚干细胞那样的均匀层。增殖抑制可以看作是集落尺寸的减小。多能性抑制,它也是分化的诱导,被认为是细胞大小的增加、细胞核大小的减少、细胞的伸长和变平、或细胞的圆化并漂浮在板上。

图29M-29R显示了用终浓度6uM的候选小分子药物处理3天的人成纤维细胞的照片,除非另有说明。在每个组中,给出-或+、++、+++或++++的分数,其中“-”表示在指定的浓度下,候选药物对细胞形态或增殖没有明显影响。“+”表示对细胞形态或增殖的轻微作用,“++++”表示对细胞形态或增殖的深远影响。

图30A-30F显示了在下一系列药物筛选实验中使用的干细胞系对照实验的照片。

图31-35A-F显示了人类幼稚状态干细胞的照片,该细胞先前在NME7_{AB}中、MUC1*抗体表面C3上生长,但在实验过程中在不存在NME7_{AB}的条件下培养,并用终浓度为6uM的候选小分子药物处理3天,除非另有说明。在每个组中,给出-或+、++、+++或++++的分数,其中“-”表示在指定的浓度下,候选药物对干细胞的多能性或增殖没有明显影响。“+”表示对多能性或增殖的轻微作用,“++++”表示对多能性或增殖的深远影响。增殖抑制可以看作是干细胞层中的孔或空白区域。多能性抑制,它也是分化的诱导,被认为是细胞大小的增加、细胞核大小

的减少、细胞的伸长和变平、或细胞的圆化并漂浮在板上。

图31-35G-L显示了人类始发状态干细胞的照片,该干细胞先前在FGF上、MEF层上生长,但在实验过程中在不存在FGF的条件下进行培养,并用终浓度为6uM的小分子候选药物处理3天,除非另有说明。在每个组中,给出-或+、++、+++或++++的评分,其中“-”表示在指定浓度下,候选药物对干细胞的多能性或增殖没有明显影响。“+”表示轻微的作用,“++++”表示对多能性或增殖的深远影响。始发状态的干细胞在限定的集落中生长,而不是像幼稚干细胞那样的均匀层。增殖的抑制可以看作是集落尺寸的减小。多能性抑制,它也是分化的诱导,被认为是细胞大小的增加,细胞核的大小减少,细胞的伸长和变平,或细胞的圆化并漂浮在板上。

图31-35M-R显示用终浓度为6uM的候选小分子药物处理3天的人成纤维细胞的照片,除非另有说明。在每个组中,给出-或+、++、+++或++++的分数,其中“-”表示在指定的浓度下,候选药物对细胞形态或增殖没有明显影响。“+”表示对细胞形态或增殖的轻微作用,“++++”表示对细胞形态或增殖的深远影响。

图36A1-36L4显示了,在一定浓度范围内的本发明化合物、或对照(单独的DMSO)存在下,在120小时对T47D乳腺癌细胞进行的癌细胞迁移、侵袭测定的照片。

图37显示了在一定浓度范围内的本发明化合物、或对照(单独的DMSO)存在下,每种化合物在120小时的抑制T47D乳腺癌细胞的癌细胞迁移或侵袭能力方面测得的IC50曲线。

图38A1-38R4显示了在一定浓度范围内的本发明化合物、或对照(单独的DMSO)存在下,在120小时的对T47D乳腺癌细胞进行的癌细胞迁移、侵袭测定的照片。

图39显示了在一定浓度范围内的本发明化合物、或对照(单独的DMSO)存在下,每种化合物在120小时的抑制T47D乳腺癌细胞的癌细胞迁移或侵袭能力方面测得的IC50曲线。

图40A1-40R4显示了在一定浓度范围内的本发明化合物、或对照(单独的DMSO)存在下,在120小时的对T47D乳腺癌细胞进行的癌细胞迁移、侵袭测定的照片。

图41显示了在一定浓度范围内的本发明化合物、或对照(单独的DMSO)存在下,每种化合物在120小时的抑制T47D乳腺癌细胞的癌细胞迁移或侵袭能力方面测得的IC50曲线。

图42A1-42R4显示了在一定浓度范围内的本发明化合物、或对照(单独的DMSO)存在下,在122小时的对T47D乳腺癌细胞进行的癌细胞迁移、侵袭测定的照片。

图43显示了在一定浓度范围内的本发明化合物、或对照(单独的DMSO)存在下,每种化合物在122小时的抑制T47D乳腺癌细胞的癌细胞迁移或侵袭能力方面测得的IC50曲线。

图44A1-44R4显示了在一定浓度范围内的本发明化合物、或对照(单独的DMSO)存在下,在124小时的对T47D乳腺癌细胞进行的癌细胞迁移、侵袭测定的照片。

图45显示了在一定浓度范围内的本发明化合物、或对照(单独的DMSO)存在下,每种化合物在124小时的抑制T47D乳腺癌细胞的癌细胞迁移或侵袭能力方面测得的IC50曲线。

图46A-46F显示了用与用于测试化合物的相同浓度的DMSO处理的对照干细胞和成纤维细胞的照片。图46A-46C是放大10倍的照片。图46D-46F是放大20倍的照片。图46A和46D是幼稚状态干细胞的照片。图46B和46E是始发状态干细胞的照片。图46C和46F是人成纤维细胞的照片。

图47-49A-F显示了人类幼稚状态干细胞的照片,该细胞先前在NME7_{AB}中、MUC1*抗体表面C3上生长,但在实验过程中在不存在NME7_{AB}的条件下培养,并用终浓度为6uM的候选小分

子药物处理24天,除非另有说明。在每个组中,给出-或+、++、+++或++++的分数,其中“-”表示在指定的浓度下,候选药物对于干细胞的多能性或增殖没有明显影响。“+”表示轻微的作用,“++++”表示对多能性或增殖的深远影响。增殖抑制可以看作是干细胞层中的孔或空白区域。多能性抑制,它也是分化的诱导,被认为是细胞大小的增加、细胞核大小的减少、细胞的伸长和变平、或细胞的圆化并漂浮在板上。

图47-49G-L显示了人类始发状态干细胞的照片,该干细胞先前在FGF中、MEF层上生长,但在实验过程中在不存在FGF的条件下进行培养,并用终浓度为6uM的候选小分子药物处理24天,除非另有说明。在每个组中,给出-或+、++、+++或++++的评分,其中“-”表示在指定浓度下,候选药物对于干细胞的多能性或增殖没有明显影响。“+”表示对多能性或增殖的轻微影响,“++++”表示对多能性或增殖的深远影响。始发状态干细胞生长为限定的集落,而不是像幼稚干细胞那样的均匀层。增殖的抑制可以看作是集落尺寸的减小。多能性抑制,它也是分化的诱导,被认为是细胞大小的增加、细胞核的大小减少、细胞的伸长和变平、或细胞的圆化并漂浮在板上。

图47-49M-R显示用终浓度为6uM的候选小分子药物处理3天的人成纤维细胞的照片,除非另有说明。在每个组中,给出-或+、++、+++或++++的分数,其中“-”表示在指定的浓度下,候选药物对细胞形态或增殖没有明显影响。“+”表示轻微的作用,“++++”表示对细胞的形态或增殖的深远影响。

图50A-50F显示了用于下一组实验的对照干细胞和成纤维细胞的照片,其中用与用于测试化合物的相同浓度的DMSO处理细胞。图50A-50C是放大10倍的照片。图50D-50F是放大20倍的照片。图50A和50D是幼稚状态干细胞的照片。图50B和50E是始发状态干细胞的照片。图50C和50F是人成纤维细胞的照片。

图51-54A-F显示了人类幼稚状态干细胞的照片,该细胞先前在NME7_{AB}中、MUC1*抗体表面C3上生长,但在实验过程中在不存在NME7_{AB}的条件下培养,并用终浓度为6uM的候选小分子药物处理24h。在每个组中,给出-或+、++、+++或++++的分数,其中“-”表示在指定的浓度下,候选药物对于干细胞的多能性或增殖没有明显影响。“+”表示轻微的作用,“++++”表示对多能性或增殖的深远影响。增殖抑制可以看作是干细胞层中的孔或空白区域。多能性抑制,它也是诱导分化,被认为是细胞大小的增加、细胞核大小的减少、细胞的伸长和变平、或细胞的圆化和浮出平板。

图51-54G-L显示了人类始发状态干细胞的照片,该干细胞先前在FGF中、MEF层上生长,但在实验过程中在不存在FGF的条件下进行培养,并用终浓度为6uM的候选小分子药物处理24h。在每个组中,给出-或+、++、+++或++++的评分,其中“-”表示在指定浓度下,候选药物对于干细胞的多能性或增殖没有明显影响。“+”表示对多能性或增殖的轻微影响,“++++”表示对多能性或增殖的深远影响。始发状态干细胞生长为限定的集落,而不是像幼稚干细胞那样的均匀层。增殖抑制可以看作是集落尺寸的减小。多能性抑制,它也是分化的诱导,被认为是细胞大小的增加、细胞核大小的减少、细胞的伸长和变平、或细胞的圆化并漂浮在板上。

图51-54M-R显示了用终浓度为6uM的候选小分子药物处理3天的人成纤维细胞的照片。在每个组中,给出-或+、++、+++或++++的分数,其中“-”表示在指定的浓度下,候选药物对细胞形态或增殖没有明显影响。“+”表示轻微的作用,“++++”表示对细胞形态或增殖的深远影响。

图55A-55F显示了用于下一组实验的对照干细胞和成纤维细胞的照片,其中用与用于测试化合物的相同浓度的DMSO处理细胞。图55A-55C是放大10倍的照片。图55D-55F是放大20倍的照片。图55A和55D是幼稚状态干细胞的照片。图55B和55E是始发状态干细胞的照片。图55C和55F是人成纤维细胞的照片。

图56-64A-F显示了人类幼稚状态干细胞的照片,该细胞先前在NME7_{AB}中、MUC1*抗体表面C3上生长,但在实验过程中在不存在NME7_{AB}的条件下培养,并用终浓度为6 μ M的候选小分子药物处理24h。在每个组中,给出-或+、++、+++或++++的分数,其中“-”表示在指定的浓度下,候选药物对干细胞的多能性或增殖没有明显影响。“+”表示对多能性或增殖的轻微影响,“++++”表示对多能性或增殖的深远影响。增殖抑制可以看作是干细胞层中的孔或空白区域。多能性抑制,它也是分化的诱导,被认为是细胞大小的增加、细胞核大小的减少、细胞的伸长和变平、或细胞的圆化并漂浮在板上。

图56-64G-L显示了人类始发状态干细胞的照片,该干细胞先前在FGF中、MEF层上生长,但在实验过程中在不存在FGF的条件下进行培养,并用终浓度为6 μ M的小分子候选药物处理24h。在每个组中,给出-或+、++、+++或++++的评分,其中“-”表示在指定浓度下,候选药物对干细胞的多能性或增殖没有明显影响。“+”表示对多能性或增殖的轻微影响,“++++”表示对多能性或增殖的深远影响。原始状态干细胞生长为限定的集落,而不是像幼稚干细胞那样的均匀层。增殖抑制可以看作是集落尺寸的减小。多能性抑制,它也是分化的诱导,被认为是细胞大小的增加、细胞核大小的减少、细胞的伸长和变平、或细胞的圆化并漂浮在板上。

图56-64M-R显示了用终浓度为6 μ M的候选小分子药物处理3天的人成纤维细胞的照片。在每个组中,给出-或+、++、+++或++++的分数,其中“-”表示在指定的浓度下,候选药物对细胞形态或增殖没有明显影响。“+”表示对细胞形态或增殖的轻微影响,“++++”表示对细胞形态或增殖的深远影响。

图65A-L显示了癌细胞迁移测定的照片,其中在单次添加指定浓度化合物120小时后,测试了新颖化合物1420的抑制T47D乳腺癌细胞迁移的能力。

图66A1-66R4显示了癌细胞迁移测定的照片,其中在单次添加指定浓度化合物120小时后,测试了本发明化合物的抑制T47D乳腺癌细胞迁移的能力。

图67A1-67R4显示了癌细胞迁移测定的照片,其中在单次添加指定浓度化合物120小时后,测试了本发明化合物的抑制T47D乳腺癌细胞迁移的能力。

图68A1-68H3显示了癌细胞迁移测定的照片,其中在单次添加指定浓度化合物120小时后,测试了本发明化合物的抑制T47D乳腺癌细胞迁移的能力。

图69A1-69K3显示了癌细胞迁移测定的照片,其中在单次添加指定浓度化合物120小时后,测试了本发明化合物的抑制T47D乳腺癌细胞迁移的能力。

图70A1-70I2显示了癌细胞迁移测定的照片,其中在单次添加指定浓度化合物120小时后,测试了本发明化合物的抑制T47D乳腺癌细胞迁移的能力。

图71-75显示了在一定浓度范围内的本发明化合物、或对照(单独的DMSO)存在下,本发明化合物在120小时的抑制T47D乳腺癌细胞的癌细胞迁移或侵袭能力方面测得的IC₅₀曲线。

图76A1-76L3显示了癌细胞迁移测定的照片,其中在单次添加指定浓度化合物120小时后,测试了本发明化合物的抑制T47D乳腺癌细胞迁移的能力。

图77A1-77R4显示了癌细胞迁移测定的照片,其中在单次添加指定浓度化合物120小时后,测试了本发明化合物的抑制T47D乳腺癌细胞迁移的能力。

图78A1-78T3显示了癌细胞迁移测定的照片,其中在单次添加指定浓度化合物120小时后,测试了本发明化合物的抑制T47D乳腺癌细胞迁移的能力。

图79-80显示了在一定浓度范围内的本发明化合物、或对照(单独的DMSO)存在下,本发明化合物在120小时的抑制T47D乳腺癌细胞的癌细胞迁移或侵袭能力方面测得的IC50曲线。

图81A1-81J4显示了癌细胞迁移测定的照片,其中在单次添加指定浓度化合物120小时后,测试了本发明化合物的抑制赫赛汀抗性乳腺癌细胞系BT474-抗性又名BT-Res2的迁移的能力。

图82显示了一定浓度范围的本发明化合物、或对照(单独的DMSO)在120h时抑制赫赛汀抗性乳腺癌细胞系BT474-抗性又名BT-Res2的癌细胞迁移或侵袭的能力方面测得的IC50曲线。

图83A1-83F4显示了癌细胞迁移测定的照片,其中测试了本发明的化合物抑制HCT-MUC1*(其为工程细胞系)迁移的能力,其中MUC1-阴性HCT-116结肠癌细胞用生长因子受体MUC1*稳定转染。在一定浓度范围内添加一次本发明的化合物,并在添加化合物后72小时拍摄图像。

图84显示了在一定浓度范围内的本发明化合物、或对照(单独的DMSO)存在下,本发明的化合物在72小时的抑制HCT-MUC1*癌细胞的癌细胞迁移或侵袭能力方面测得的IC50曲线。

图85A1-85J4显示了癌细胞迁移测定的照片,其中测试了本发明化合物抑制三阴性乳腺癌细胞系BT20迁移的能力。添加一次一定浓度范围内的本发明的化合物,并在添加化合物72小时后拍摄图像。

图86显示了在一定浓度范围内的本发明化合物、或对照(单独的DMSO)存在下,本发明化合物在72小时的抑制三阴性乳腺癌细胞BT20的癌细胞迁移或侵袭能力方面测得的IC50曲线。

图87A1-87J4显示了癌细胞迁移测定的照片,其中测试了本发明的化合物抑制MUC1阴性HCT-116结肠癌细胞迁移的能力。添加一次一定浓度范围内的本发明的化合物,并在添加化合物72小时后拍摄图像。

图88显示了在一定浓度范围内的本发明化合物、或对照(单独的DMSO)存在下,本发明化合物在72小时的抑制HCT-116结肠癌细胞的癌细胞迁移或侵袭能力方面测得的IC50曲线。

图89A-89H显示了在指定浓度下用本发明化合物处理72小时的幼稚状态干细胞的RT-PCR测量的图,其中测量的基因是AXIN2(β -连环蛋白的替代物),加上HES3、GNAS、VLDLR、EXT1、FBXL17、RHOC和GREB IL,其都是对诱导分化至关重要的超级增强子靶基因。

图90A-90C显示了用指定浓度的本发明化合物处理72小时的癌细胞的RT-PCR测量图,其中所测量的基因是AXIN2(β -连环蛋白的替代物,对其的抑制作为诱导分化),加上转移性生长因子NME7_{AB}和NME7-X1。

图91A-91C显示了用指定浓度的本发明化合物处理72小时的幼稚状态干细胞的RT-PCR

测量图,其中所测量的基因是微RNA-145,其是干细胞分化的预兆。

图92A-92C示出了用指示浓度的本发明化合物处理72小时的T47D癌细胞的RT-PCR测量图,其中所测量的基因是微RNA-145,其是干细胞分化的预兆。

具体实施方式

定义

在本申请中,“一”和“一个”用于指单个和多个对象。

如本文所用,“大约”或“基本上”通常提供不受限于精确数字的余地。例如,如在上下文多肽序列的长度中所使用的,“约”或“基本上”表示该多肽不限于所列举的氨基酸数目。只要存在诸如结合活性之类的功能活性,就可以包括在N-末端或C-末端添加或减去的一些氨基酸。

如本文所用,与一种或多种其他治疗剂“组合”给药包括以任何顺序的同时(共同)和连续给药。

如本文所用,“载体”包括药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂,其在所采用的剂量和浓度下对暴露于其的细胞或哺乳动物无毒。药学上可接受的载体通常是pH缓冲水溶液。药学上可接受的载体的实例包括但不限于缓冲剂,例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,其包括抗坏血酸;低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白,例如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,例如EDTA;糖醇,例如甘露醇或山梨糖醇;成盐的抗衡离子,例如钠;和/或非离子表面活性剂,例如TWEEN[®]、聚乙二醇(PEG)和PLURONICS[®]。

如本文所用,“药学上可接受的载体和/或稀释剂”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣抗细菌和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。这种介质和药剂用于药物活性物质的用途是本领域众所周知的。除非任何常规介质或药剂与活性成分不相容,否则考虑将其用于治疗组合中。补充活性成分也可以掺入组合中。

以剂量单位形式配制肠胃外组合物特别有利,以易于给药和剂量均匀。本文所用的剂量单位形式是指适合作为待治疗的哺乳动物受试者的单位剂量的物理上离散的单位。每个单元包含预定量的活性物质,该活性物质经计算可与所需的药物载体一起产生所需的治疗效果。本发明的剂量单位形式的规范由(a)活性物质的独特特性和要实现的特定治疗效果、以及(b)在配制这种活性物质的领域中固有的局限性直接决定,所述活性物质用于治疗患有身体健康受损的疾病的活体受试者的疾病。

将主要活性成分与合适的药学上可接受的载体以单位剂型混合以于有效量方便有效地给药。单位剂型可以例如包含0.5 μ g至约2000mg范围内的量的主要活性化合物。以比例表示,活性化合物通常以约载体的0.5 μ g/ml存在。在包含补充活性成分的组合物的情况下,所述剂量通过参考所述成分的常规剂量和给药方式来确定。

术语“MUC1生长因子受体”(MGFR)是功能定义,意指MUC1受体的与活化配体例如生长因子或修饰酶诸如切割酶相互作用的部分,以促进细胞增殖。MUC1的MGFR区域是最接近细胞表面的胞外部分,并且由MGFR的主要序列(PSMGFR)的大部分或全部定义。MGFR既包括未修饰的肽,也包括经过酶修饰的肽,例如磷酸化、糖基化等。本发明的结果与这样的机制是一

致的,在该机制中,使该部分在MUC1裂解后可与配体接触在与致瘤相关的位点上,导致部分或全部IBR从细胞中释放出来。MGFR也称为MUC1*。

术语“MUC1生长因子受体的主要序列”(PSMGFR)或“FLR”是在某些情况下定义大部分或全部MGFR的肽序列,以及如下面所定义的肽序列的功能变体和片段。PSMGFR定义为下表1中列出的SEQ ID NO:3,并且其所有功能性变体和片段具有最多20个氨基酸取代的任何整数值(即1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20)和/或在其N端和/或C端最大20个氨基酸的整数值添加或缺失。在以上文本中,“功能性变体或片段”是指具有与SEQ ID NO:3的肽特异性结合或以其他方式特异性相互作用的能力的此类变异体或片段、与SEQ ID NO:3的肽特异性结合或以其他方式特异性相互作用的配体。PSMGFR的一个实例(SEQ ID NO:3的PSMGFR肽的功能变体,称为nat-PSMGFR-指“天然”)是SEQ ID NO:11(称为var-PSMGFR),与nat-PSMGFR不同,它包括-SPY-序列而不是天然-SRY-(请参见序列列表中的粗体文本)。与天然形式相比,Var-PSMGFR可能具有增强的构象稳定性,这对于某些应用(例如抗体生产)可能很重要。PSMGFR既包括未修饰的肽,也包括经过酶修饰(例如磷酸化、糖基化等)的肽。

如本文所用,术语“PSMGFR”是MUC1生长因子受体的一级序列的首字母缩写,如下所述:GTINVHVDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPPFSAQSGA(SEQ ID NO:3)。就这一点而言,“N-10PSMGFR”、“N-15PSMGFR”或“N-20PSMGFR”中的“N数”是指在PSMGFR的N端已缺失的氨基酸残基的数目。同样,“C-10PSMGFR”、“C-15PSMGFR”或“C-20PSMGFR”中的“C数”是指在PSMGFR的C端已缺失的氨基酸残基的数目。

如本文所用,“MUC1*的胞外结构域”是指MUC1蛋白的缺少串联重复结构域的胞外部分。在大多数情况下,MUC1*是切割产物,其中MUC1*部分由没有串联重复的短胞外结构域、跨膜结构域和细胞质尾部组成。MUC1切割的确切位置可能未知,也许是因为它似乎可以被一种以上的酶切割。MUC1*的胞外结构域将包含PSMGFR序列的大部分,但可能具有额外的10-20个N端氨基酸。

如本文所用,编号为1-10的“NME家族蛋白”或“NME家族成员蛋白”是组合在一起的蛋白,因为它们都具有至少一个NDPK(核苷酸二磷酸激酶)结构域。在某些情况下,NDPK结构域在能够催化ATP转化为ADP方面不起作用。NME蛋白以前称为NM23蛋白,编号为H1和H2。最近,已鉴定多达十(10)个NME家族成员。在此,术语NM23和NME是可互换的。在本文中,术语NME1、NME2、NME5、NME6、NME7、NME8和NME9用于指天然蛋白以及NME变体。在某些情况下,这些变体在大肠杆菌中表达更好或更可溶、比天然序列蛋白更易溶。例如,本说明书中使用的NME7可以表示天然蛋白或变体,例如NME7-AB,其具有优异的商业适用性,因为变体允许在大肠杆菌中可溶性、适当折叠的蛋白高产表达。NME7-AB主要由NME7 A和B结构域组成,但缺少DM10结构域(SEQ ID NO:12)的大部分,其位于天然蛋白的N端。本文所指的“NME1”可与“NM23-H1”互换。还希望本发明不受NME蛋白的确切序列限制。突变体NME1-S 120G,也称为NM23-S 120G,在整个申请中可以互换使用。优选S120G突变体和P96S突变体,因为它们偏爱二聚体形成,但是在本文中可称为NM23二聚体、NME1二聚体或二聚体NME1或二聚体NM23。

如本文所指,NME7是指具有约42kDa的分子量的天然NME7。

“NME7家族”是指全长NME7以及分子量为约30kDa、33kDa的天然存在的或人工产生的裂解形式、或分子量为约25kDa的裂解形式、缺少或部分缺少DM10前导序列(SEQ ID NO:12)的

变体,其是由SEQ ID NO:5代表的NME7的大约氨基酸1-95的NME7,例如NME7b、NME7-X1、NME7-AB或重组NME7蛋白或其变体,其序列可能会改变以允许有效表达或增加产量、溶解度或其他性质,从而使NME7更有效或在商业上更可行。“NME7家族”还可以包括“NME7-AB样”蛋白,其是在癌细胞中表达的30至33kDa范围内的蛋白。

如本文所用,“诱导分化或抑制干细胞多能性或干细胞生长”的药剂是指单独或组合导致干细胞处于始发状态或处于幼稚状态的蛋白、小分子或核酸,以分化或抑制干细胞多能性或干细胞生长。此类药剂的实例包括SMAD抑制剂和Dorsomorphin。

如本文所用,相对于始发干细胞,“在幼稚状态下抑制上调基因的表达或活性”的药剂是指单独或组合的蛋白、小分子或核酸,其在幼稚干细胞中引起对通常上调基因的抑制。这种药剂的实例包括siRNA、反义核酸和小分子。

如本文所用,相对于始发细胞,“在幼稚状态下增加下调基因的表达或活性”的药剂是指单独或组合的蛋白、小分子或核酸,其在幼稚干细胞中引起对通常下调基因的上调。这样的药剂的实例包括编码指示分化的蛋白的基因,例如波形蛋白、纤连蛋白和NF1、还有微RNA例如miR-145。

如本文所用,相对于成纤维细胞,“在幼稚状态下抑制上调基因的表达或活性”的药剂是指单独或组合的蛋白、小分子或核酸,其在幼稚干细胞中引起对通常上调基因的抑制。这类药剂的实例包括对多能基因OCT4、SOX2、KLF4或c-Myc特异的反义核酸或siRNA,以及编码波形蛋白、纤连蛋白、NF1的基因或基因产物本身。

如本文所用,相对于成纤维细胞,“在幼稚状态下增加下调基因的表达或活性”的药剂是指单独或组合的蛋白、小分子或核酸,其在幼稚干细胞中引起对通常下调基因的上调。这样的药剂的实例包括编码下调基因的核酸或蛋白本身,以及诱导分化的药剂例如SMAD抑制剂、Dorsomorphin等。

如本文所用,“促进多能性”或“使体细胞回复至干样或癌样状态”的药剂是指单独或组合的蛋白、小分子或核酸,其诱导或抑制某些基因的表达,使遗传标记转变为更类似于干细胞或癌细胞的遗传标记。实例包括但不限于NME1二聚体、NME7、NME7-X1、NME7-AB、2i、5i;抑制MBD3、CHD4、BRD4或JMJD6表达的核酸如siRNA;与人NME1、NME2、NME5、NME6、NME7、NME 8或NME9,优选与容纳NDPK结构域的区域具有高度序列同源性的微生物NME蛋白。

如本文所用,关于称为“小分子”的药剂,其可以是分子量在50Da与2000Da之间、更优选在150Da与1000Da之间、还更优选在200Da和750Da之间的合成化学或基于化学的分子。

如本文所用,关于被称为“天然产物”的药剂,其可以是化学分子或生物分子,只要该分子存在于自然界即可。

如本文所用,术语“癌症”可包括但不限于:胆道癌;膀胱癌;脑癌,包括胶质母细胞瘤和髓母细胞瘤;乳腺癌;宫颈癌;绒毛膜癌;结肠癌;子宫内膜癌;食道癌;胃癌;血液肿瘤,包括急性淋巴细胞性白血病和骨髓性白血病;多发性骨髓瘤;艾滋病相关的白血病和成人T细胞白血病淋巴瘤;上皮内肿瘤,包括Bowen病和Paget病;肝癌;肺癌;淋巴瘤,包括霍奇金氏病和淋巴细胞性淋巴瘤;神经母细胞瘤;口腔癌,包括鳞状细胞癌;卵巢癌,包括上皮细胞、基质细胞、生殖细胞和间充质细胞引起的卵巢癌;胰腺癌;前列腺癌;结肠癌;直肠癌;肉瘤,包括平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤和骨肉瘤;皮肤癌,包括黑色素瘤、Kaposi肉瘤、基底细胞癌和鳞状细胞癌;睾丸癌,包括生殖肿瘤,例如精原细胞瘤、非精原细胞瘤

(畸胎瘤、绒毛膜癌)、基质瘤和生殖细胞瘤；甲状腺癌，包括甲状腺腺癌和髓样癌；肾癌，包括腺癌和Wilms肿瘤。优选的癌症是：乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌、卵巢癌、结直肠癌和脑癌。良性或恶性形式的肿瘤也被认为处于癌性状态之内。

如本文所述的术语“癌症治疗”可包括但不限于：化学疗法、放射疗法、辅助疗法或前述方法的任何组合。可能变化的治疗方面包括但不限于：剂量、给药定时、或持续时间或疗法；并且可能会或可能不会与其他治疗（可能在剂量、定时或持续时间上有所不同）组合使用。癌症的另一种治疗方法是手术，可以单独使用或与任何上述治疗方法结合使用。医学领域的普通技术人员可以确定适当的治疗。

如本文所用，“炎症性疾病”或病症是指以免疫应答为特征的疾病或病症，所述免疫应答在特定区域中涉及非特异性免疫应答。这种疾病或病症可以包括但不限于，类风湿关节炎、炎性肠综合征、Crohn病、骨关节炎、哮喘、皮炎、牛皮癣、囊性纤维化、移植后迟发和慢性实体器官排斥反应、多发性硬化症、系统性红斑狼疮、Sjogren综合征、Hashimoto甲状腺炎、多发性肌炎、硬皮病、Addison病、白癜风、恶性贫血、肾小球肾炎、肺纤维化、自身免疫性糖尿病、糖尿病视网膜病变、鼻炎、缺血再灌注损伤、血管成形术后再狭窄、慢性阻塞性肺疾病（COPD）、Graves病、胃肠道过敏、结膜炎、动脉粥样硬化、冠状动脉疾病、心绞痛、癌症转移、小动脉疾病或线粒体疾病。

如本文所用，“身体样品”是指获自受试者的任何身体组织或体液样品。优选的是体液，例如淋巴液、唾液、血液、尿液、乳汁和乳腺分泌物等。在某些实施例中，血液是优选的。可以通过标准方法获得用于本文所述的各种方法的组织和/或细胞的样品，所述标准方法包括但不限于：组织活检，包括穿孔活检和细胞刮取、针头活检以及通过吸气或其它方法收集血液或其他体液。

如本文所用，“受试者”是指哺乳动物，并且优选地是指具有可以通过将本发明的组合物给予于受试者内的部位来治疗的疾病的任何哺乳动物（优选地，人）。例子包括人类，非人类的灵长类动物、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗或猫。通常，本发明针对与人类一起使用。

如本文所用，“MUC1阳性癌症”或“MUC1*阳性癌症”是指以MUC1的异常表达为特征的癌症，其中异常可以是指MUC1基因或基因产物过度表达，或MUC1或MUC1*的正常表达模式的丧失，在健康状态下，该表达模式仅限于细胞的顶端边界或导管的腔边缘、或裂解并从细胞表面脱落的MUC1量的增加。

序列表自由文本

关于除a、g、c、t以外的核苷酸符号的使用，它们遵循WIPO标准ST.25附录2表1中列出的惯例，其中k表示t或g；n代表a、c、t或g；m代表a或c；r代表a或g；s代表c或g；w代表a或t，并且y代表c或t。

MTPGTQSPFF LLLLLTVLTV VTGSGHASST PGGEKETSAT QRSSVPSSTE KNAVSMTSSV
LSSHSPGSGS STTQQQDVTL APATEPASGS AATWGQDVTS VPVTRPALGS TTPPAHDVTS APDNKPAPGS
TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs
APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS
TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs
APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS
TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTs

APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS
 TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS
 APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS
 TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS
 APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS
 TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS
 AP DTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDNRPALGS TAPPVHNVT ASGSASGSAS
 TLVHNGTSAR ATTPASKST PFSIPSHSD TPTTLASHST KTDASSTHHS SVPPLTSSNH STSPQLSTGV
 SFFFLSFHIS NLQFNSSLED PSTDYYQELQ RDISEMFLQI YKQGGFLGLS NIKFRPGSVV VQLTLAFREG
 TINVHDVETQ FNQYKTEAAS RYNLTISDVS VSDVPPFSA QSGAGVPGWG IALLVLCVL VALAIVYLIA
 LAVCQCRRKN YGQLDIFPAR DTYHPMSEYP TYHTHGRYVP PSSTDRSPYE
 KVSAGNGGSSLSYTNPAVAAAANL (SEQ ID NO:1) 描述了全长MUC1受体 (Mucin 1前体, Genbank
 登录号: P15941)。

GTIN VHD VETQFNQ YKTE A AS RYNLTIS D VS VS D VPPFSA QSG AG VPGWGIALLV
 VCVLVALAIVYLIALAVCQCRRKNYGLDIFPARDTYHPMSEYPTY HTHGRYVP PS S TDRS P YEKVS
 AGNGGS S LS YTNP A V AAAS ANL (SEQ ID NO:2) 描述了截短的MUC1受体同种型, 其在N端
 具有nat-PSMGFR, 包括全长MUC1受体的跨膜和胞质序列。

GTIN VHD VETQFNQ YKTE A AS RYNLTIS D VS VS D VPPFSA QSG G A (SEQ ID NO:3)
 描述了MUC1生长因子受体的天然一级序列的胞外结构域 (nat-PSMGFR-“PSMGFR”的实例)。

QFNQ YKTE A AS RYNLTIS D VS VS D VPPFSA QSG G A (SEQ ID NO:4) 描述了PSMGFR
 的N-10肽, 其中N端的10个氨基酸已被去除。

DPETMNHS ERF VFIAE W YDPN AS LLRR YELLF YPGDGS VEMHD VKNHRTFLKRTKYDNLHLE
 DLFIGNKVNVFSRQLVLIDYGDQYARQLGSRKEKTL ALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEA
 LDFHVDHQSRPFFNELIQFIT TGPIIAMEILRDDAI CE WKRLGVP ANS G V ARTD AS ES IR
 ALFGTDGIRN A AHGPDS F AS AAREMELFFPS S GGC GPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGMLNTLYSVH
 FVNRRAMFIFLMYFMYRK (SEQ ID NO:5) 描述了NME7氨基酸序列 (NME7: GENBANK登录号
 AB209049)。

MEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRP FFNELIQFITTGPIIAM
 EILRDDAICEWKRLGVPANSGVARTDASESIRALFGTDGIR NAAHGPD SFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKF
 TNCTCCIVKPHAVSEGGLLGI LMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAM
 EIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDG LLE VQYFFKILDN (SEQ ID
 NO:6) 描述了人NME7-AB。

MMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGVP ANS GV ARTD AS ES
 IR ALFGTDGIRN AAHGPD S FAS AAREMELFFPS S GGC GP ANT AKFTNCTCCIVKPHAVSEGGLLKIL
 MAIRDAGFEISAMQMFNMDRVN VEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIA
 RH LRPGLRAIFGKTKIQNAVH CTDLPEDGLLEVQYFFKILDN* (SEQ ID NO:7) 描述了人NME7-X1。

MEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRP FFNELIQFITTGPIIAM
 EILRDDAICEWKRLGVPANSGVARTDASESIRALFGTDGIR NAAH GPDS FAS A AREMELFF- (SEQ ID
 NO:8) 描述了人NME7-A1。

MPSSGGCGPANTAKFTNCTCCrVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQM FNMDRVNVEEFYEVYKGVV TEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCG PADP EIHRLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLE VQYFFKILDN (SEQ ID NO:9) 描述了人NME7-B3。

AIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF (SEQ ID NO:10) 描述了B3,其是NME7B肽3 (B结构域)。

GTIN VHD VETQFNQ YKTE A AS P YNLTIS D VS VS D VPFPPS AQS G A (SEQ ID NO:11) 描述了具有增强的稳定性的MUC1生长因子受体的天然一级序列的“SPY”功能变体的胞外结构域 (var-PSMGFR-“PSMGFR”的一个实例)。

MNHSERFVFIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTK YDNLHLEDLFIGNKVNVFSR QLVLIDYGDQYTARQLGSRK (SEQ ID NO:12) 描述了NME7的DM10结构域。

癌细胞和干细胞

干细胞和癌细胞有很多共同点。现在,研究人员发现,未分化干细胞的许多标志物实际上也是癌细胞的标志物。相反,许多曾经被认为是癌症标志物的分子标志物现在被重新定义为干细胞标志物。例如,我们发现先前被鉴定为转移性癌症标志物的CXCR4是幼稚干细胞的标志物。癌细胞还被表征为经历上皮到间充质转变 (EMT), 其中上皮细胞终末分化,而间充质细胞分化程度较低,并且是干细胞样细胞 (Mani et al., 2008)。肿瘤学家长期以来一直观察到,随着癌症分期的进展,受累组织的细胞看起来越来越不成熟或不分化,看起来更像干细胞。病理学家使用分化程度的表观来对癌症分期进行分类,早期癌症被分类为中度分化,而侵袭性或转移性癌症则被分类为低度分化。

此外,我们先前已经报道了我们的发现,即介导所有癌症的75%以上生长的生长因子受体MUC1*存在于100%的多能人类干细胞上 (Hikita et al., 2008; Smagghe et al., 2013)。最近,我们发现了一种生长因子NME7_{AB},它可以结合并激活MUC1*的生长、存活和自我更新功能 (Carter et al., 2016)。通过在含有NME7_{AB}作为唯一生长因子的基本培养基中进行培养,可以将人类干细胞维持在多能状态。在NME7_{AB}中培养的干细胞保持在称为幼稚的最早状态。NME7_{AB}存在于第3天的人桑椹胚的每个细胞中,其中所有细胞都处于最早的幼稚状态。到人类囊胚的第5天时,NME7_{AB}局限于内细胞团,根据定义,这些细胞是幼稚的。NME7_{AB}在人囊胚的第5天后应关闭,除非在睾丸中发现。然而,我们发现NME7以与NME7_{AB}和NME7-X1相对应的截短形式在侵袭性和转移性癌症中表达 (WO2015/023694)。我们证明了向常规癌细胞中添加NME7_{AB}使其可以从少至50种植入的癌细胞转变为更具转移性的癌细胞,从而在动物体内形成肿瘤,而非转移性癌细胞则需要4-6M植入的细胞才能形成肿瘤。此外,向动物注射NME7_{AB}会导致植入的癌细胞转移。这些数据进一步在分子水平上在干细胞与癌细胞之间,更特别地在侵袭性或转移性癌症与幼稚干细胞之间建立了功能联系。

这些结果暗示促进干细胞多能性的途径与促进癌症的途径相同。抑制干细胞多能性或生长、或诱导干细胞分化的药剂是当给予于患者时预防或治疗癌症的有效抗癌剂。

发明人已经表明,将干细胞转化或维持为幼稚状态的药剂能够将癌细胞转变为更具转移性的状态。因此,幼稚干细胞在许多方面与侵袭性或转移性癌细胞相似。这些结果暗示促进幼稚干细胞多能性的途径与促进癌细胞转移的途径相同。预测是,抑制幼稚干细胞多能性或生长、或诱导干细胞分化的药剂是当给予于患者时是预防或治疗转移性癌症的有效抗癌剂。

幼稚干细胞和始发干细胞之间的巨大差异表明,这两种不同类型的干细胞多能生长并抵抗通过不同途径的分化。因此,抑制幼稚干细胞的多能性或增殖而不抑制始发状态干细胞多能性或增殖或对始发状态干细胞具有较轻微作用的候选药物,是在治疗或预防侵袭性或转移性癌症方面最有效的候选药物。

在本发明的一方面,在可以是候选药物的药剂的存在下培养干细胞,观察到该药剂抑制干细胞多能性或生长、或诱导干细胞分化,并且所述药剂给予患者用于预防或治疗癌症。在本发明的一方面,干细胞是人的。在另一方面,干细胞处于幼稚状态。在某些情况下,通过在NME1二聚体、NME7、NME7_{AB}、NME7-X1中培养或通过其他报道的将干细胞保持在更幼稚状态的方法,干细胞可以保持在幼稚状态(Silva et al.,2008;Hanna et al.,2010;Gafni et al.,2013;Theunissen et al.,2014;Ware et al.,2014)。在又一方面,观察到该药剂抑制幼稚干细胞而不是始发状态干细胞的多能性或生长,或诱导幼稚干细胞而不是始发状态干细胞的分化,或者该药剂对始发状态干细胞的作用较小,并且将该药剂给予有发展风险或已诊断患有转移性癌症的患者。因为我们发现所有多能干细胞均为MUC1*阳性,并且幼稚干细胞表达NME7_{AB},所以如上所述鉴定的药剂对于治疗MUC1*阳性、NME7_{AB}阳性或NME7-X1阳性癌症将是最有效的。

癌症术语

如本文所用,术语癌症“迁移”和“侵袭”是同义词,并且是转移性癌细胞的特征。

本文所用的迁移测定是指用诸如胶原蛋白、纤连蛋白等的胞外基质蛋白包被表面,将癌细胞接种到该表面上,但是将其从区域移出或限制它们接种到区域上,然后在细胞进入限制空间时照相,或者在存在有效抑制剂的情况下抑制细胞进入限制空间。其中将细胞从区域中移出的迁移测定称为刮擦测定或伤口测定,将限制细胞在区域中铺板的迁移测定本文中称为platypus测定。

如本文所用,转移性癌症包括已经浸润或侵袭邻近组织、或者已经转移到淋巴结、或者已经转移到除了原始癌症的器官之外的器官中的癌症。如本文所用,术语转移性癌症包括已知容易转移的那些癌症。例如,具有一定皮肤深度的黑色素瘤在统计学上将在可预测的时间内转移。另一个实例是胰腺癌,已知会在可预测的时间内转移,尤其是转移到肝脏。

病理学家具有评估肿瘤侵袭性或转移潜力的两种主要方法。一种方法是分配等级或阶段。1级意味着肿瘤细胞看起来最像正常细胞,称为分化良好。分化良好的癌细胞生长缓慢。2级意味着肿瘤处于中等分化,因此生长较快。3级意味着肿瘤细胞看起来非常异常且分化差,这是生长最快的癌细胞。

病理学家还基于活检组织的分析和其他诊断技术,使用对肿瘤评分的TNM系统。“T”代表延伸到邻近组织,“N”代表淋巴结受累,“M”代表转移到远端器官。具体来说,T评分的范围是0-4,其中零表示没有肿瘤迹象,而4则涉及已经扩展到相邻组织的大肿瘤。N评分在0-3的范围内,其中N0表示没有淋巴结受累的证据,N1表示癌症已经扩散到附近的淋巴结或少量淋巴结。N2和N3表示肿瘤已扩散到更多的淋巴结和/或更远的淋巴结。M得分为0或1,其中M0表示没有转移的证据,而M1表示癌症已经扩散到远处的器官或除起源器官以外的器官。

药物筛选

在此,我们描述了治疗剂,和鉴定用于预防或治疗癌症、转移性癌症或用于预防癌症复发的治疗剂的方法。在一个实施例中,这些治疗剂用于预防或治疗MUC1阳性、MUC1*阳性、

NME7阳性、NME7_{AB}阳性或NME7-X1阳性的癌症。我们已经确定,控制幼稚干细胞的生长和多能性的信号传导途径不同于控制始发干细胞的生长和多能性的信号传导途径。此外,我们发现介导幼稚干细胞生长或多能性的相同途径也介导癌细胞的生长和转移能力。我们发现抑制干细胞多能性或生长、或诱导干细胞分化的药剂是抑制癌细胞增殖的药剂,当给予于患者时,它们是预防或治疗癌症的有效药剂。抑制幼稚干细胞多能性或生长、或诱导幼稚干细胞分化的药剂是抑制癌细胞迁移(其是转移性癌症的特征)的药剂,当给予于患者时,将是预防或治疗侵袭性或转移性癌症的有效抗癌剂。抑制幼稚干细胞而不是始发干细胞的多能性或生长、或诱导幼稚干细胞而不是始发干细胞分化的药剂,或对始发干细胞的影响小得多的药剂是预防或治疗侵袭性或转移性癌症的有效药剂。

因此,鉴定治疗剂以治疗处于发展风险或诊断为癌症的患者:1) 培养多能状态干细胞; 2) 使多能干细胞群体与候选药物接触; 3) 鉴定抑制多能干细胞的多能性或生长、或诱导多能干细胞分化的候选药物; 4) 得出结论,抑制多能干细胞的多能性或生长、或诱导多能干细胞分化的候选药物是抗癌剂。

鉴定治疗剂以治疗处于发展风险或诊断为转移性癌症的患者: 1) 培养幼稚状态干细胞; 2) 使干细胞与候选药物接触; 3) 鉴定抑制幼稚干细胞多能性或生长、或诱导幼稚干细胞分化的候选药物; 4) 得出结论,抑制幼稚干细胞多能性或生长、或诱导幼稚干细胞分化的候选药物是用于治疗或预防侵袭性癌症或癌症转移的抗癌剂。

替代地,为了鉴定治疗剂以治疗处于发展风险或诊断为转移性癌症的患者: 1) 培养幼稚状态干细胞,并可选地平行培养始发状态干细胞; 2) 使两个干细胞群体都与候选药物接触; 3) 鉴定抑制幼稚干细胞但可选地不是始发干细胞多能性或生长、或诱导幼稚干细胞但可选地不是始发干细胞分化、或对始发干细胞的影响小得多的候选药物; 4) 得出结论,抑制幼稚干细胞但可选地不是始发干细胞多能性或生长、或诱导幼稚干细胞但可选地不是始发干细胞分化、或对始发干细胞影响较小的候选药物,是用于治疗或预防癌症转移的抗癌剂。

以这些方式筛选以评估其作为抗癌剂或抗转移剂的潜力的药剂可以是任何形式,包括但不限于小分子、天然产物、抗体、抗体片段、文库或抗体或抗体片段、肽、肽模拟物、核酸、反义核酸、DNA、RNA、编码或非编码、抑制性RNA、细菌和微生物。在本发明的一方面,干细胞是人源的。在本发明的另一方面,干细胞是灵长类动物源的。在本发明的又一方面,干细胞是哺乳动物源的。在本发明的又一方面,干细胞是啮齿动物源的。

在本发明的另一方面,通过鉴定在幼稚干细胞中而不在始发干细胞中上调的基因来鉴定新颖抗癌或抗转移性药物靶标。在本发明的另一方面,通过鉴定在幼稚干细胞中而不在始发干细胞中上调的微RNA,鉴定了新颖抗癌或抗转移性药物靶标。

药物筛选结果

W02009/042815公开了在直接结合测定中,一系列的咪啉分子抑制了MUC1*的胞外结构域和NME蛋白尤其是NME1二聚体和NME7_{AB}之间的相互作用。我们先前还表明,抑制MUC1*-NME相互作用的同一系列咪啉也抑制癌细胞的生长。我们测试了一组包含十个小分子的小分子,其中包括三个咪啉(图1)以及生物制剂的与始发状态干细胞相比抑制幼稚干细胞多能性或生长的能力。我们先前证明抗MUC1*单克隆抗体E6或对应于MUC1*胞外域的合成肽FLR(也称为PSMGFR),通过抑制MUC1*-NME7_{AB}或MUC1*-NME1相互作用抑制癌症和干细胞多能性和生长。我们还测试了新颖抗NME7抗体#56和#61;我们以前曾证明,它们抑制NME7_{AB}的能力,

使其将常规癌细胞转化为转移性癌细胞,尽管#61比#56更有效得多。我们先前还表明,一些咪啉小分子通过抑制MUC1*-NME7_{AB}或MUC1*-NME1相互作用来抑制癌细胞的生长。

JQ1是据报道抑制BRD4的小分子,并且已经显示出抑制癌细胞迁移和癌细胞增殖,但是没有报道对干细胞有任何作用。在存在和不存在干细胞生长因子的情况下进行干细胞筛选测定:NME7_{AB}用于生长幼稚干细胞,或FGF用于生长始发干细胞。如果存在同源的生长因子,则生物学分子或小分子将必须与生长因子竞争才能获得效果。因此,我们预计当缺少生长因子(用于始发干细胞的FGF或用于幼稚干细胞的NME7_{AB}或NME1二聚体)时,会有更多的影响。结果总结在图2的表中。目测确定化合物对干细胞的影响并将化合物分级为0-4,其中4为最大影响,0为不可观察的影响。观察到的主要影响是从多能干细胞形态(一种小圆形细胞的鹅卵石模式,具有较大细胞核细胞质比)到分化干细胞形态(一种细长、较大且扁平的细胞,具有较小细胞核细胞质比)的变化。一些化合物还严重抑制干细胞的生长。将化合物添加至幼稚状态干细胞或始发状态干细胞的终浓度为6 μ M。在这种特殊情况下,通过在含有NME7_{AB}或NME1二聚体的培养基中进行培养,将幼稚状态干细胞保持为幼稚状态。但是,可以使用其他方法,例如2i和5i(Silva et al.,2008,Nichols and Smith,2009,Theunissen et al.,2014)将干细胞维持在更幼稚的状态。在这种情况下,尽管已知任何含bFGF的培养基都能将干细胞保持在始发状态,但在bFGF中、MEF层上培养了始发状态干细胞。

我们已经表明JQI对幼稚干细胞生长具有抑制作用,但对始发干细胞生长没有抑制作用。此外,先前的研究表明JQ1具有抗炎作用(Belkina et al,2013;Meng et al,2014)。因此,本研究中鉴定出的化合物也应具有抗炎作用,并可用于治疗肥胖症、哮喘、慢性消化性溃疡、结核、类风湿性关节炎、慢性牙周炎、溃疡性结肠炎和克罗恩病、慢性鼻窦炎、慢性活动性肝炎等的炎症。

在所测试的十个小分子和四种生物剂中,除了MN1130对始发化干细胞集落具有适度的影响外,没有一个对始发干细胞有任何影响。但是,当在幼稚干细胞上测试相同的药剂时,四种生物制剂中的三种和三种咪啉中的两种会深远抑制干细胞多能性和生长并诱导分化。注意,这些药剂诱导的幼稚干细胞的形态变化与干细胞开始分化时发生的形态变化一致(用虚线表示)。细胞变扁平,呈更大的纺锤形,细胞核与细胞质的比例降低。

除了图1中所示的小分子外,还测试了抗MUC1*Fab、FLR肽又名PSMGFR肽以及抗NME7抗体#56和#61。图2总结了这些候选药物在幼稚干细胞与始发干细胞中的表现,其中证实的药物命中是该化合物诱导幼稚干细胞分化但对FGF-培养的始发干细胞没有影响或影响较小的药物。图3-10显示了用小分子、Fab、MUC1*胞外域肽“FLR”或小分子处理的干细胞的图片。图3-6显示没有药剂或化合物显著诱导始发状态干细胞的分化。然而,图7-10显示几种药剂诱导幼稚状态干细胞的分化。分化部分由虚线表示。具体而言,在这些浓度下,抗MUC1*E6 Fab、FLR肽、抗NME7#61、MN572、MN0642和MN1130均可诱导幼稚状态干细胞分化,并被预测为有效的癌症抑制剂和癌症转移抑制剂。可以将它们给予患者以预防或治疗癌症或转移性癌症。已经显示E6 Fab抑制所有MUC1*阳性癌细胞的生长。另外,显示抗MUC1*E6 Fab在动物中强烈抑制MUC1*阳性肿瘤生长。类似地,化合物MN0642已经显示出在体外抑制癌细胞的生长。FLR(PSMGFR)肽和抗NME7#61已显示抑制正常癌细胞向转移性癌细胞的转化。

测试了与本发明化合物没有相似但据报道抑制癌症生长或迁移的几种其他小分子,并发现其抑制了干细胞特别是幼稚干细胞的多能性、或生长,或诱导其分化。例如,据报道,一

个与咪喹啉不相似的小分子JQ1 (+) (图1) 可抑制炎症 (Belkina et al., 2013)、癌症多能性 (Fillippakopoulos et al., 2010) 和癌细胞迁移 (Tang et al., 2013)。据报道, JQ1 (+) 抑制BRD4, 其无活性对映体JQ1 (-) 没有作用 (Fillippakopoulos et al., 2010)。据报道, BRD4是NME7的调节剂, 是癌基因c-Myc的调节剂, 并且是在癌细胞和干细胞中过表达某些基因的超级增强子的成分。目前, 尚不清楚BRD4的这些声称功能中哪一个是正确的。用JQ1 (+)、非活性立体异构体JQ1 (-)、BRD4特异性siRNA或JMJD6特异性siRNA处理始发状态干细胞3天。这些药剂似乎均未诱导始发状态干细胞的分化, 但JQ1 (+) 可能对始发状态干细胞集落的大小有适度的影响 (图11), 并且还似乎引起了一些异常形态 (图12)。但是, JQ1 (+) 显著诱导幼稚状态干细胞分化并抑制其生长 (图14E-F、15E-F和16E-F)。无论是将幼稚干细胞培养在NME7_{AB} (图13-14) 还是NME1二聚体 (图15-16) 中, JQ1 (+) 都能抑制幼稚干细胞多能性和生长, 并诱导分化。由于JQ1 (+) 是炎症、癌细胞迁移和癌细胞增殖的已知抑制剂, 因此这些结果表明, 有效治疗炎症或预防或治疗癌症的药剂还抑制幼稚干细胞多能性或生长、或诱导干细胞分化。因此, 抑制幼稚干细胞多能性或生长、或诱导干细胞分化的药剂也是炎症的有效治疗或癌症的预防或治疗。

然后我们测试了扩大的药剂组, 包括已知抑制癌症生长或迁移的药剂 (图17) (Horm et al., 2012; Meng&Yue, 2014; Zhen et al., 2014), 这是侵袭性或转移性癌症的特征。我们还合成了一系列新颖的小分子, 在干细胞药物筛选测定中对其进行了测试, 然后在一系列生物学测定中对其进行了测试, 以测试其抑制癌细胞迁移、侵袭或增殖的能力。干细胞筛选和生物学测定的结果总结在图18A-18E的表中。

图19A-19P显示了对照干细胞, 或向其中添加了已知的抗迁移化合物地塞米松和SU11274的干细胞的图片。

癌细胞的强迁移是癌细胞侵袭其他组织和转移的特征。典型的迁移测定包括用纤连蛋白、胶原蛋白等涂覆细胞培养板, 铺板癌细胞并贯穿细胞形成疤痕, 并测量癌细胞侵袭空隙所花费的时间。提供更可靠数据的另一种方法是Platypus系统, 它是一种特殊的多孔细胞培养板, 带有并列设置的塞子组, 其在每个孔的中心都阻塞了一个圈。在塞子到位的同时将癌细胞铺板, 然后在细胞附着到板表面后将其取出。将候选药物添加到每个孔中, 然后根据时间拍摄照片, 以跟踪候选药物对癌细胞迁移或侵袭的抑制作用。在我们的癌细胞迁移测定中, 已使用Image J软件对已迁移到空白空间中的细胞数量进行了量化。总结这种癌细胞迁移测定结果的条形图如图20所示。将已知的抗迁移化合物的效果与抗MUC1*Fab E6和前几个小分子前导相比较。癌细胞迁移测定的结果如图21所示。癌细胞迁移测定的照片和总结其活性的条形图如图22所示。与已知的抗迁移分子SU11274相比, 两种新颖的小分子MN1186和MN1194的作用如图22A-22U所示。图22V是示出对于多种化合物在0、24小时或48小时的时间测量的癌细胞迁移抑制的图。图22W是示出小分子的抑制作用随其浓度变化关系的图。图22X是示出如何测量和计算本发明的小分子的IC₅₀的图。

所有人多能干细胞均为MUC1*阳性。幼稚状态干细胞还表达原始生长因子NME7_{AB}, 它是MUC1*的活化配体。乳腺癌细胞系T47D来自转移性乳腺癌患者。T47D细胞表达任何市售细胞系中最高水平的MUC1*。我们发现T47D细胞还表达NME7_{AB}和另一种剪接异构体NME7-X1, 它们都是激活MUC1*生长因子受体的生长因子。

首先在筛选干细胞药物的抑制干细胞多能性或增殖的能力的测定中鉴定命中化合物。

然后,我们测试命中物抑制癌细胞迁移、侵袭(这是转移性癌症的特征)的能力,然后我们最终测试了命中物抑制癌细胞增殖的能力。结果是抑制干细胞多能性和/或增殖的化合物也抑制了癌细胞的迁移、侵袭性和/或增殖。这些研究表明,本发明的化合物抑制多种癌细胞的迁移和/或侵袭。已显示本发明的化合物抑制DU145 (MUC1*⁺/NME7AB⁺⁺⁺/NME7-X1⁺⁺⁺) 前列腺癌细胞、和SK-OV-3 (MUC1*⁺) 卵巢癌细胞、A549 (MUC1*^{L0}) 肺癌细胞、PC-3 (MUC1*⁻/NME7AB⁺⁺⁺/NME7-X1⁺⁺⁺) 前列腺癌细胞、CHL-1 (MUC1*⁺/NME7⁺) 黑色素瘤细胞、OV-90 (MUC1*⁻) 卵巢癌细胞、CAPAN-2 (MUC1*⁺) 胰腺癌细胞、ZR-75-1 (MUC1*⁺⁺) 乳腺癌细胞以及其他细胞的迁移、侵袭和/或增殖。

还使用先前报道的癌细胞迁移或侵袭抑制剂,例如BRD4抑制剂JQ1+及其非活性对映体JQ1-、c-Met抑制剂SU11274以及图17所示其它等,进行了小分子抑制癌细胞迁移或增殖的研究。这些化合物中的一些在某种程度上抑制了癌细胞的迁移或侵袭,但是大多数化合物也抑制了成纤维细胞(这是正常健康细胞的替代物)的生长,这意味着它们可能对患者产生毒副作用。

本发明化合物的生物学测试数据显示在图18A-18E中。

随着癌症治疗变得更加有针对性,目标是开发优先抑制癌细胞的增殖、迁移或侵袭性,同时对正常健康细胞产生最小影响的治疗剂。没有“正常”细胞系,因为正常的终末分化细胞不会像干细胞或癌细胞那样不断分裂。但是,成纤维细胞比干细胞分化程度更高,但能够在规定的时间内自我复制。我们测试了选择的本发明化合物以确定这些化合物是否仅仅是细胞毒性的,或者它们是否选择性地影响干细胞,重要的是癌细胞,而不是正常的健康细胞。在这里,我们使用成纤维细胞作为正常细胞的替代物。由于成纤维细胞不会改变形态,因此该测定的读数仅是化合物对增殖的影响。在将6uM的测试化合物分别添加到正在生长的人成纤维细胞中之后48或72小时拍摄照片。对每种化合物对成纤维细胞增殖的作用进行评分,其中“+”表示抑制25%的成纤维细胞生长、“++”表示抑制50%的生长、“+++”表示抑制75%的生长。图23A-23D显示了培养中的人成纤维细胞的照片,仅用0.2% DMSO处理作为对照。图24A-24F显示了在终浓度为500nM时,JQ1+ (图24A-24C) 与非活性对映体JQ1- (图24D-24F) 对人幼稚状态干细胞 (图24A、24D)、人始发状态干细胞 (图24B、24E) 或人成纤维细胞 (图24C、24F) 的作用的照片。可以看出,JQ1+对成纤维细胞的作用与对始发状态干细胞的作用相同,这表明它比不影响后来的成纤维细胞祖细胞的化合物具有更多的副作用。图25A-25F显示了先前已知的癌细胞迁移抑制剂JQ1和SU11274与导致现在成为本发明化合物的衍生物的原始命中物,对人成纤维细胞祖细胞生长的影响的照片。从图中可以看出,本发明的大多数新颖化合物对成纤维细胞的生长几乎没有影响。它们对始发状态干细胞的影响也很小或没有,但对幼稚状态干细胞(我们认为这是癌细胞的替代物)的抑制作用最大。本发明的化合物强烈抑制幼稚干细胞的多能性和增殖以及癌细胞的迁移和增殖,但是对成纤维细胞祖细胞几乎没有影响或通常没有影响,这一事实表明该化合物不是细胞毒性剂。相反,其他先前报道的癌细胞迁移抑制剂对成纤维细胞祖细胞的作用与对干细胞和癌细胞的作用相同,这表明它们可能对患者产生毒性副作用。

实验表明,本发明的新化合物通过诱导成熟(也称为分化)来抑制干细胞和癌细胞两者的多能性、增殖和/或迁移。用本发明的化合物处理过的幼稚干细胞的RT-PCR测量表明,本发明的化合物诱导分化标志物的上调。因用本发明化合物以浓度依赖方式处理而增加表达

的基因是纤连蛋白和波形蛋白和NF1,纤连蛋白和波形蛋白均随着干细胞的分化而增加,而NF1是在干细胞开始分化为神经系时首先增加的基因之一。响应于用本发明的化合物处理,纤连蛋白、波形蛋白或NF1表达增加的事实表明,该化合物诱导分化,而终末分化的细胞不自我复制。因此,诱导分化标志物的本发明化合物可用于治疗癌症,因为根据定义,癌细胞已经去分化,这使得它们能够连续自我复制。当用本发明的化合物治疗癌细胞时,在癌症中上调的E-钙粘着蛋白下调。注意,先前已知的癌细胞迁移和增殖抑制剂JQ1+和SU11274不会引起分化标志物的上调,即诱导干细胞分化。类似地,本发明的新颖化合物诱导癌细胞的分化。转移标志物E-钙黏着蛋白的表达减少,分化标志物纤连蛋白、波形蛋白和NF1的表达增加。

本发明的新颖化合物是高度特异性的。它们特异性抑制干细胞和癌细胞的多能性和/或增殖。本发明的新颖化合物对MUC1*阳性和/或NME7_{AB}或NME7-X1阳性的癌症最有效。尽管我们发现NME1二聚体、NME7_{AB}和NME7-X1都是MUC1*生长因子受体的活化配体,并且它们结合到其胞外结构域,但我们已经获得了充分的证据表明NME7_{AB}和NME7-X1都具有其他结合伴侣并且可以发挥致癌作用,独立于MUC1*。

NME7_{AB}是使最早的幼稚干细胞生长的天然生长因子。单独使用NME7_{AB}足以满足幼稚人干细胞的生长和多能性要求。在人第3天的囊胚中,所有细胞均对NME7_{AB}呈阳性。到第5天,NME7_{AB}细胞仅限于内细胞团,根据定义,该细胞团包含幼稚状态干细胞。虽然NME7_{AB}在所有幼稚干细胞中都有表达,但据报道除了睾丸外它在成年组织中没有表达。但是,我们在所有检查过的转移性癌症中都发现了它。我们已经表明,幼稚干细胞和癌细胞都分泌NME7_{AB}和NME7-X1。我们显示了,在干细胞和癌细胞中,NME7_{AB}和NME7-X1都与MUC1*的胞外域结合,并通过配体诱导的MUC1*胞外域的二聚化激活多能性和生长。我们进行的大量免疫组化研究表明,NME7_{AB}和NME7-X1两者在癌细胞中过表达,表达的增加与肿瘤的分期有关。PCR实验表明,本发明的化合物引起癌细胞中NME7_{AB}和NME7-X1表达的降低。

分析了先导化合物的构效关系(SAR),并设计和合成了新颖衍生物化合物,目的是提高功效、降低IC₅₀(半数最大作用的浓度)和提高溶解度。这些化合物的结构显示为化合物编号MN1292-MN1471。图18A-18E的表显示了用这些化合物中的每一种进行的生物学测定的结果。图26-35显示了化合物对幼稚状态干细胞、始发状态干细胞或成纤维细胞的作用的照片。抑制干细胞多能性尤其是幼稚状态多能性,但不影响成纤维细胞等成熟细胞的化合物预计将是有效的抗癌治疗剂。从图18的列表数据中可以看出,许多新化合物MN1292-MN1471有效抑制癌细胞的迁移和增殖,其IC₅₀处于低纳摩尔范围。在干细胞筛选中,这些化合物抑制幼稚干细胞多能性,但对更成熟的始发状态干细胞或更成熟的成纤维细胞几乎没有影响或没有影响。图36-45显示了照片、曲线图和IC₅₀曲线,其量化了这些新化合物对癌细胞迁移的影响。

进一步的药物化学技术和构效关系的分析导致开发了甚至更有效和更具选择性的癌细胞迁移、侵袭和增殖抑制剂。数据表明,从构效关系中获得的药物化学技术和知识导致该组化合物的IC₅₀浓度大大降低。例如,MN1413将幼稚干细胞多能性和增殖抑制了100%或得分为“4”,而对更成熟的始发状态干细胞没有影响,并且对成纤维细胞也没有影响,而成纤维细胞是正常细胞的替代物。MN1413将癌细胞迁移抑制了83%,IC₅₀为100nM,并且将癌细胞增殖抑制了约50%。MN1423将幼稚干细胞多能性和增殖抑制了100%,或得分为“4”,但对

始发状态干细胞或成纤维细胞没有影响。MN1423抑制癌细胞迁移84%，IC50为12nM，抑制癌细胞增殖50%。MN1428还可以将幼稚干细胞多能性和增殖抑制100%，或得分为“4”，但对始发状态干细胞或成纤维细胞没有影响。MN1428将癌细胞迁移抑制了79%，IC50为7nM。这些化合物的干细胞药物筛选结果示于图46-64。这些图证明了这些化合物抑制幼稚干细胞的多能性和增殖的能力，而实际上对始发状态干细胞或成纤维细胞没有影响，其中成纤维细胞是正常健康细胞的模拟物。图65-88显示了照片和曲线图，显示了这些化合物对癌细胞迁移或侵袭的影响，并且曲线图显示了每种化合物的IC50。

值得注意的是，本发明的化合物抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭，并且这种活性与癌细胞对于普通癌症生长因子受体MUC1*是阳性还是阴性无关。回想一下，100%的幼稚干细胞是MUC1*阳性。大多数癌症也是MUC1*阳性。我们已经表明，本发明的化合物抑制了MUC1*癌细胞系的癌细胞迁移，包括T47D乳腺癌细胞、BT20三阴性乳腺癌细胞、BT474-Res2耐化疗HER2阳性乳腺癌细胞、SKOV3卵巢癌细胞、DU145前列腺癌细胞和Capan2胰腺癌细胞以及其他许多癌细胞。然而，本发明的化合物还显示出抑制某些MUC1*阴性前列腺癌细胞的迁移。例如，本发明的化合物抑制PC3前列腺癌细胞和HCT-116MUC1*阴性结肠癌细胞的迁移和增殖。

这些数据与本发明化合物通过诱导诱导分化的关键基因的表达来阻断癌细胞侵袭性的机制一致，这通过迁移和侵袭来证明。用本发明化合物处理的幼稚干细胞的RT-PCR测量显示了分化标志物的上调。由于用本发明化合物以浓度依赖性方式处理而增加表达的基因，为纤连蛋白、波形蛋白和NF1，它们都是分化的标志物。

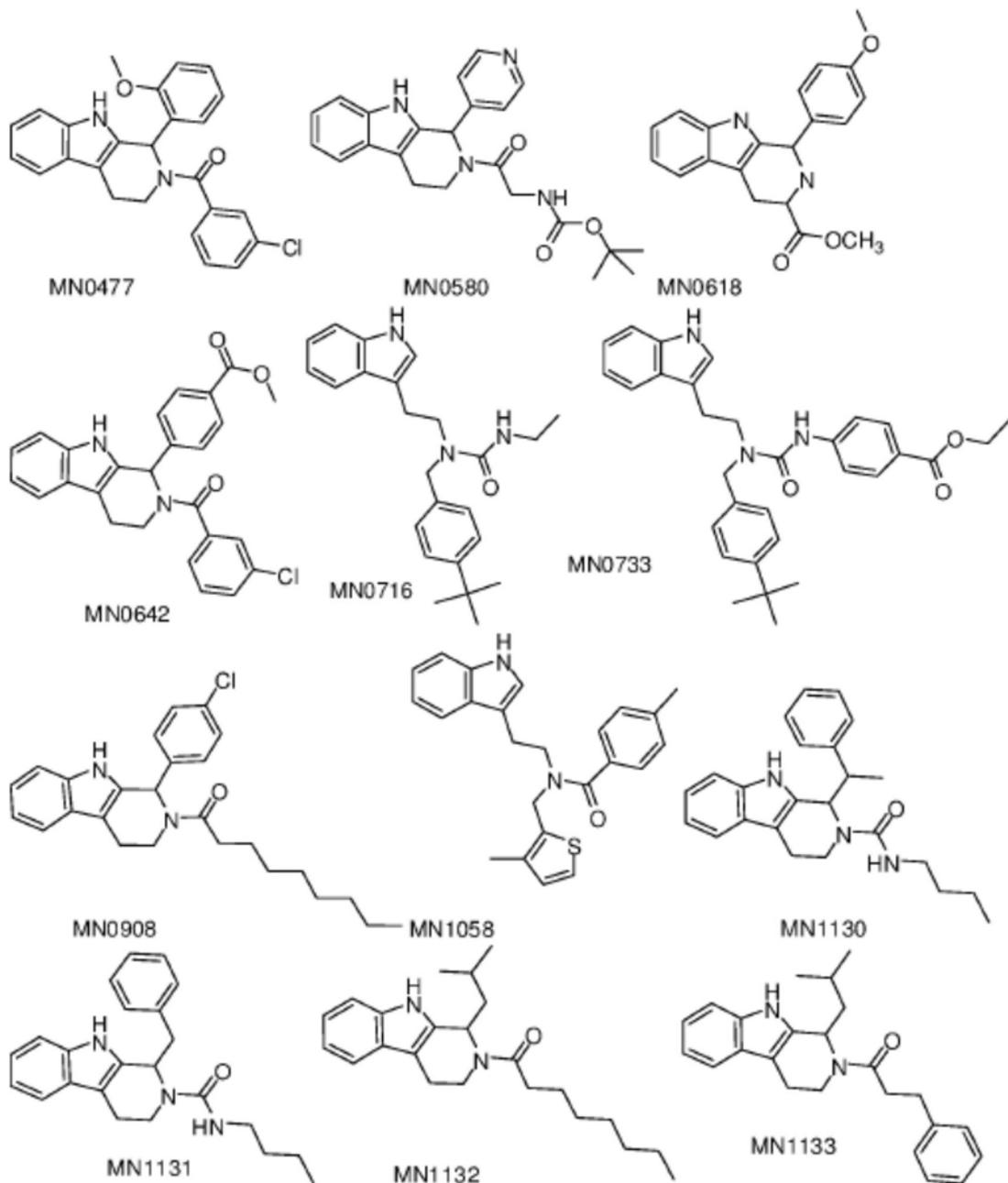
除了与分化相关的典型基因外，我们还观察了用本发明化合物处理后，特定的超级增强子基因在干细胞和癌细胞中都表达。在胚胎干细胞中，所有介体成分的大约40%仅堆积在数百个增强子位点，因此被称为超级增强子。与典型增强子相比，超级增强子使靶基因的表达增加了许多倍，因此，这种方法可以迅速执行关键的细胞命运决定，例如在干细胞的情况下，是全能生长还是分化。在关键的细胞命运决定（例如干细胞是否应该全能生长或分化）中的失控，将对胚胎的发育有着灾难性的后果。研究人员最近发现，这种超增强子现象只发生在干细胞和癌细胞中。这些超增强的基因构成了主ON/OFF开关，可以在干样或癌性去分化状态与分化状态之间来回切换。我们假设在更成熟的始发状态干细胞中而不是幼稚干细胞中由超级增强子上调的基因，将是干细胞和癌细胞两者分化的关键介体。癌细胞会去分化，因此诱导分化会抑制癌细胞的生长和转移。在始发状态干细胞中而不是幼稚干细胞中超上调的基因包括LIN7A、VLDLR、GNAS、ZIC5、HES3、BDNF、FBXL17、RHOC、KLHL4、GREB1L、EXT1、FEZF1、SULF1、BRD2、CDH9和LRRTM2。特别感兴趣的是BRD2、HES3、GNAS，BRD2本身通过与染色质的相互作用来调节1,450个其他基因的表达，HES3调节基本的螺旋-环-螺旋转录因子，GNAS介导了许多对分化至关重要的因子的活性。增加这些基因或上面列出的任何其他超级增强子基因表达的化合物，将通过诱导其分化来抑制癌症。此外，我们最近发现，β-连环蛋白是干细胞分化的关键调节因子。活化的核β-连环蛋白的表达减少会诱导干细胞分化。由于在技术上难以量化核和活化的β-连环蛋白，因此通常测量AXIN2作为β-连环蛋白的替代物，因为AXIN2的表达直接由核的、活化的β-连环蛋白驱动。我们和其他人已经表明，微RNA-145 (miR-145) 的表达增加是干细胞分化开始的预兆 (Xu, N, et al. MicroRNA-145 Regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and Represses Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. Cell. 137 (4), p647-658, 15 May 2009. DOI:10.1016/j.cell.2009.02.038; and

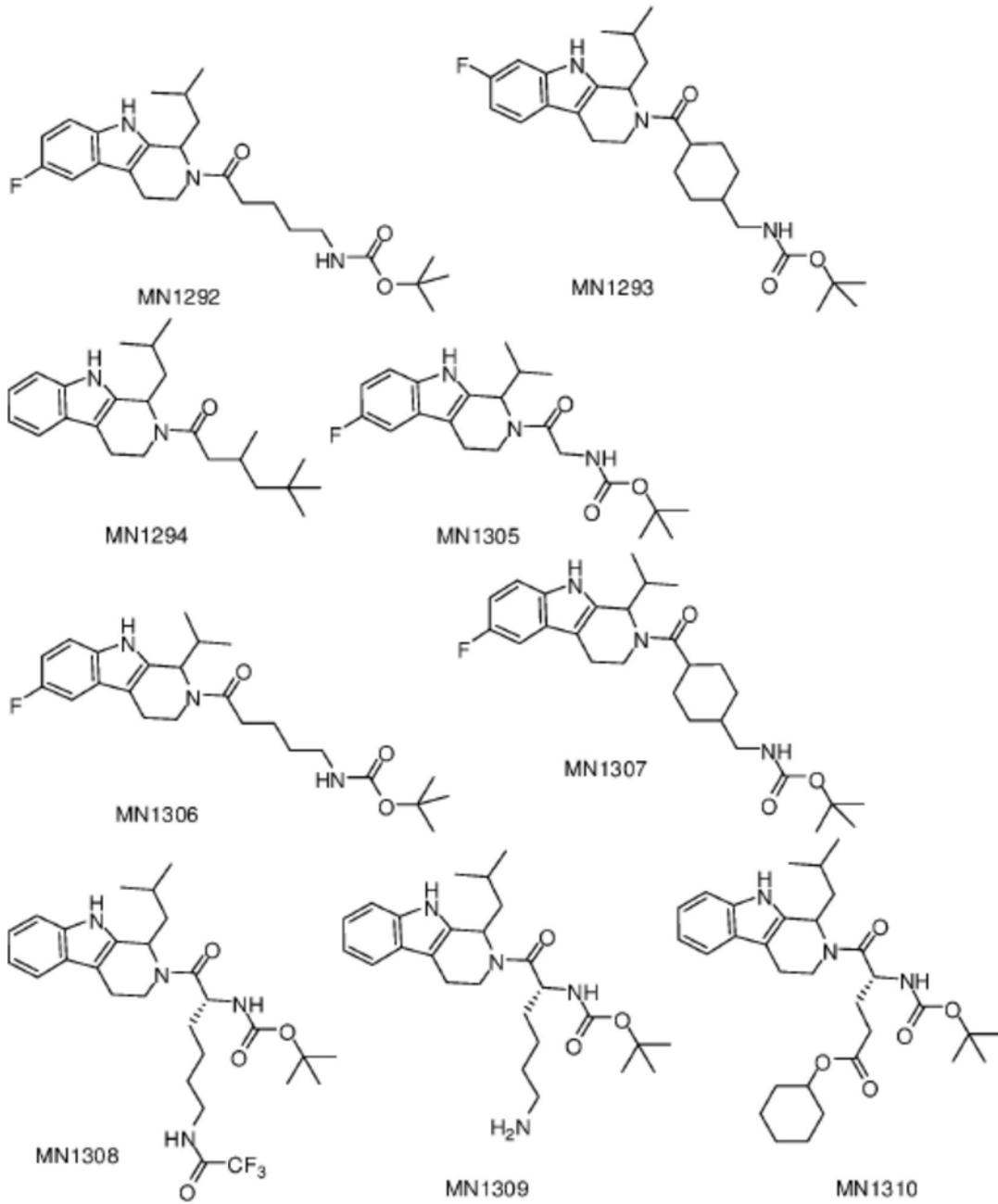
Smagghe et al PLoS ONE 2013)。Smagghe和Mo(Cancer Res:70(1);378-87,2010)报告说,miR-145表达的增加会抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭。他们报道了miR-145直接抑制肿瘤转移基因MUC1,并通过扩展MUC1*抑制了活化的 β -连环蛋白的表达。

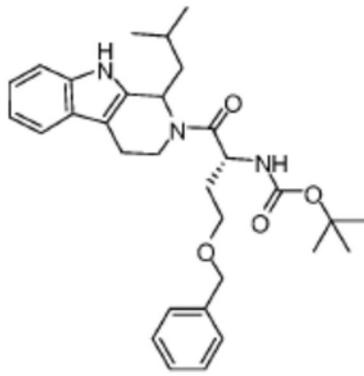
我们使用RT-PCR来测量其中一些超级增强子基因的表达变化,即AXIN2(活化的 β -连环蛋白的替代物)、miR-145、MUC1和MUC1*配体NME7_{AB}和NME7-X1。这些实验表明,本发明的化合物诱导了作为分化的关键介体的超级增强子的几个靶基因的表达。另外,本发明的化合物抑制了AXIN2的表达,并且通过延伸抑制了 β -连环蛋白(其诱导分化)的表达(图89A-89B)。另外,本发明的化合物抑制了MUC1*配体NME7_{AB}和NME7-X1的表达,我们已经证明它们诱导了体外和动物体内的癌症转移(图90)。本发明的化合物还增加了miR-145的表达,miR-145已显示出诱导分化并抑制肿瘤细胞的侵袭性和迁移。图91A-91C显示了用化合物MN1413、MN1423和1428处理的幼稚状态干细胞的RT-PCR测量图。可以看出,这些化合物增加了miR-145的表达。图92A-92C显示了用化合物MN1413、MN1423和1428处理的T47D癌细胞的RT-PCR测量图。可以看出,这些化合物也增加了miR-145在癌细胞中的表达。因此,本发明化合物通过诱导对分化至关重要的基因(其中一些基因是超级增强子靶基因)和miR-145的表达,同时降低 β -连环蛋白、MUC1及其生长因子NME7_{AB}的表达,而至少部分地抑制肿瘤细胞迁移和侵袭。本发明的新颖化合物是用于治疗或预防癌症和转移性癌症的有效药剂。本发明的新颖化合物对于治疗MUC1*阳性和/或NME7_{AB}或NME7-X1阳性的癌症将是最有效的。在本发明的一方面,测试来自患者的生物样品中是否存在MUC1*、NME7_{AB}或NME7-X1,并且在发现患者的癌症对于MUC1*、NME7_{AB}或NME7-X1呈阳性时,将本发明的化合物以适合于预防或治疗癌症的量给予于患者。在一种情况下,对患者样品进行测试,例如PCR,以确定编码MUC1、NME7或NME7-X1的核酸的量。在本发明的一方面,如果那些基因的表达与人多能干细胞中的表达相当或更高,则认为该患者的癌症为MUC1*阳性、NME7_{AB}阳性或NME7-X1阳性。在本发明的另一方面,如果那些基因的表达等于或大于那些细胞中EEF1A1表达的0.5%,则认为患者的癌症为MUC1*阳性、NME7_{AB}阳性或NME7-X1阳性。在本发明的又一方面,如果患者的组织样本与结合至PSMGFR肽或N-10肽的抗体接触,并染色组织而病理学家标准评分为1-4(“+-++++”),则认为该患者的癌症为MUC1*阳性。在本发明的另一方面,如果患者的组织标本与结合NME7的B3肽的抗体接触,并染色组织而病理学家标准评分为1-4(“+-++++”),则认为该患者的癌症为NME7_{AB}阳性或NME7-X1阳性。

化合物

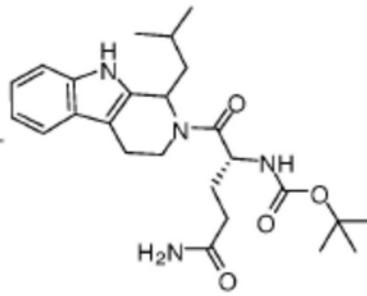
以下列出了用于治疗或预防癌症的示例性化合物。总结以下示例性化合物的表列于图18A-18E。



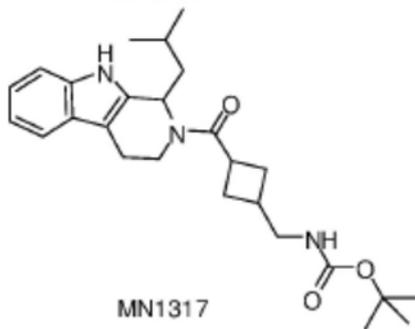




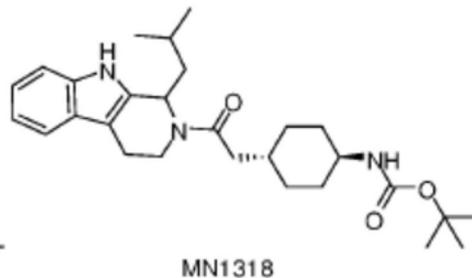
MN1311



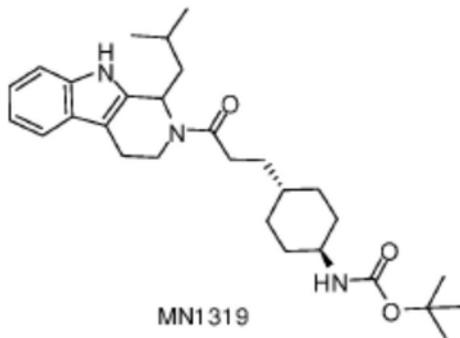
MN1312



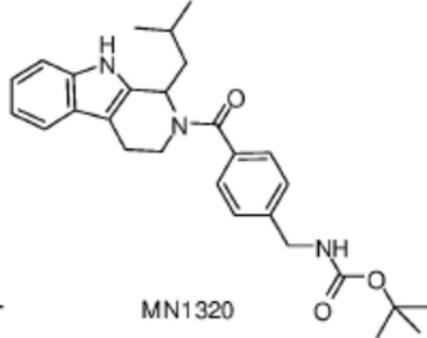
MN1317



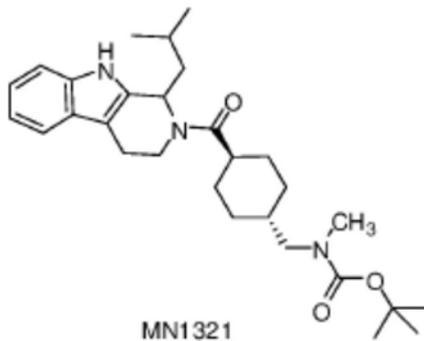
MN1318



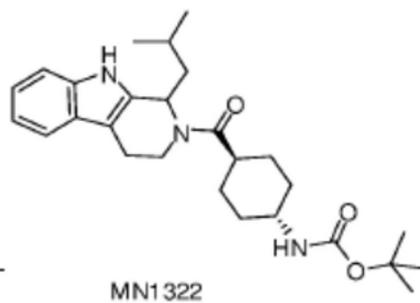
MN1319



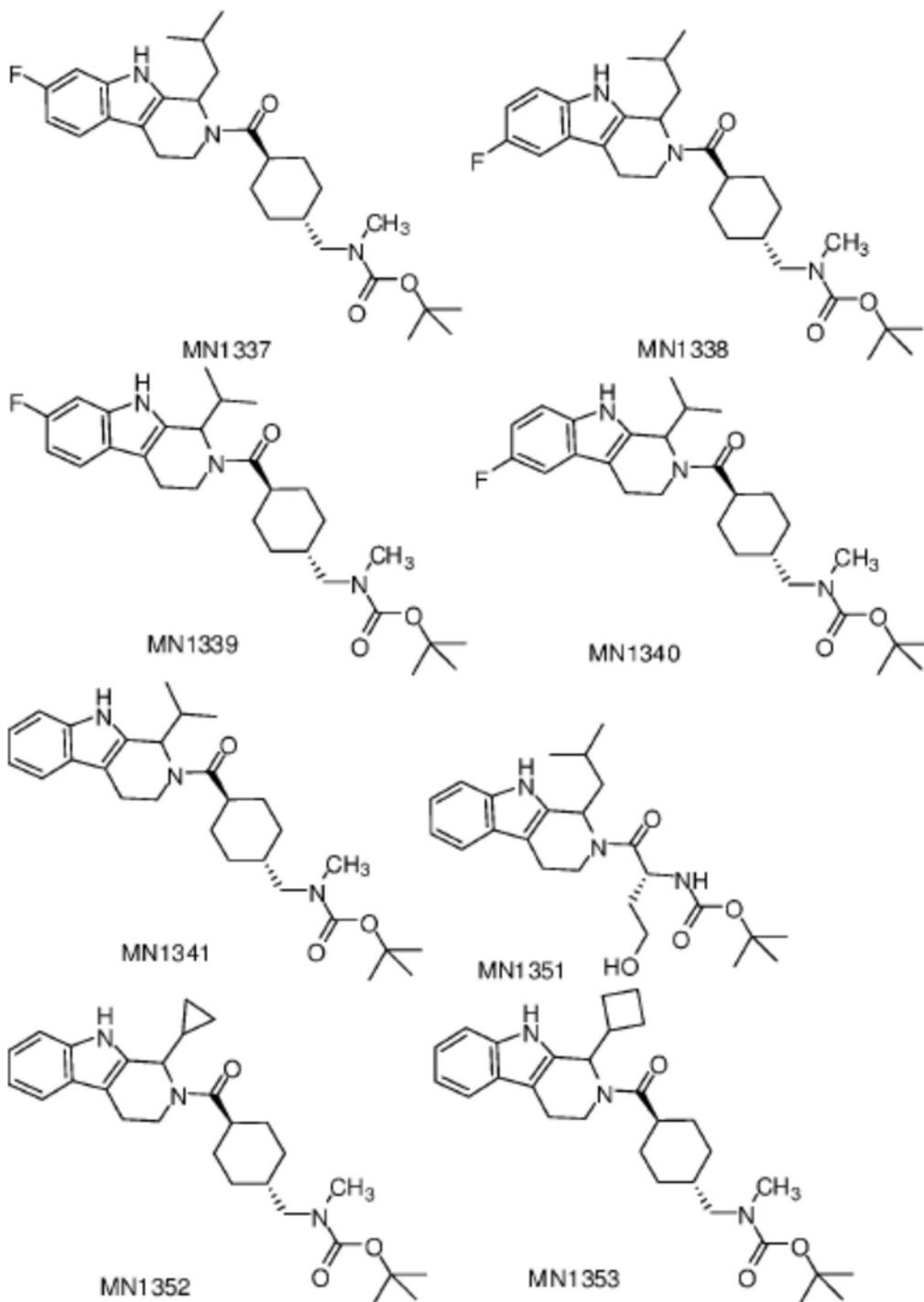
MN1320

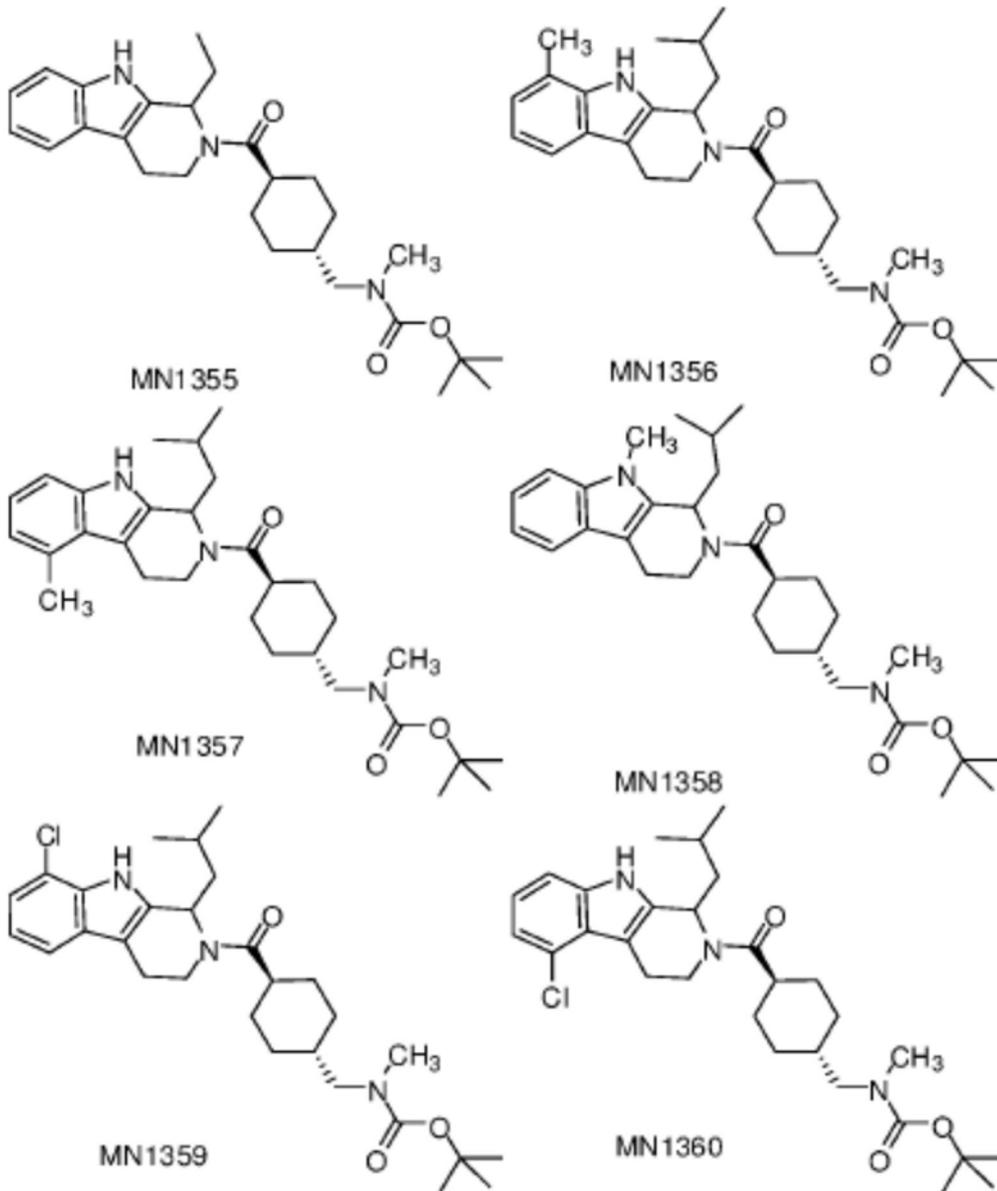


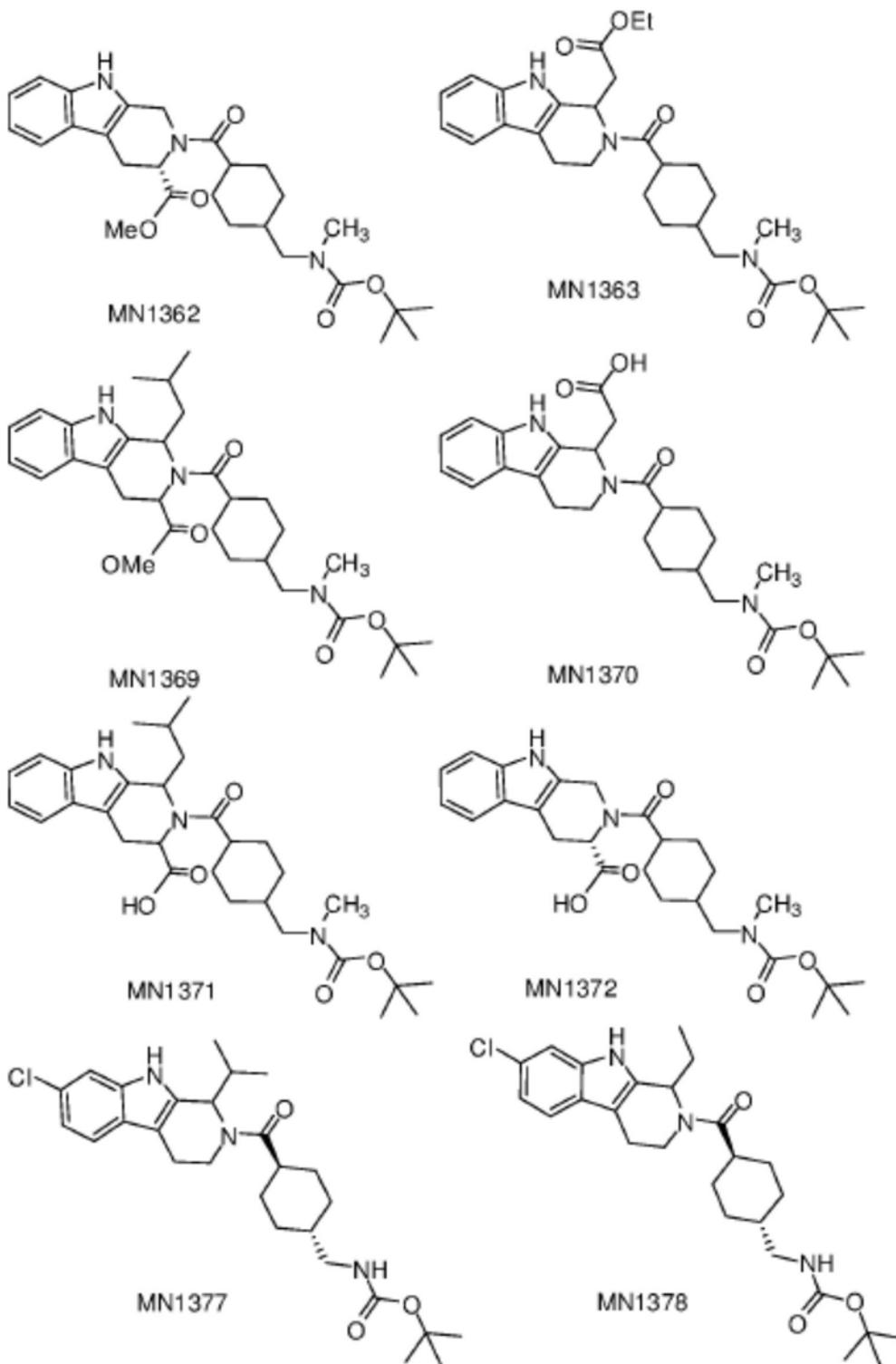
MN1321

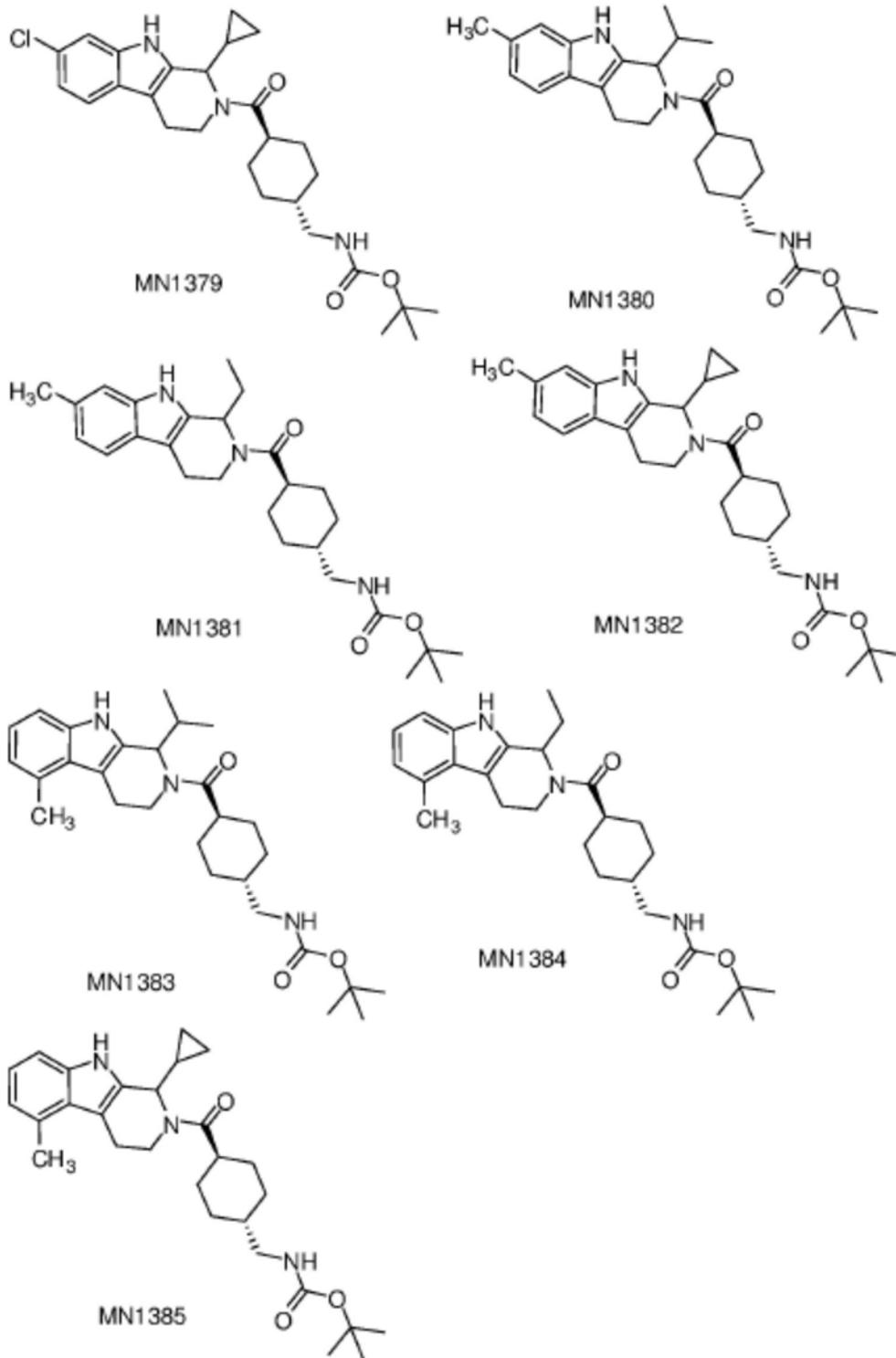


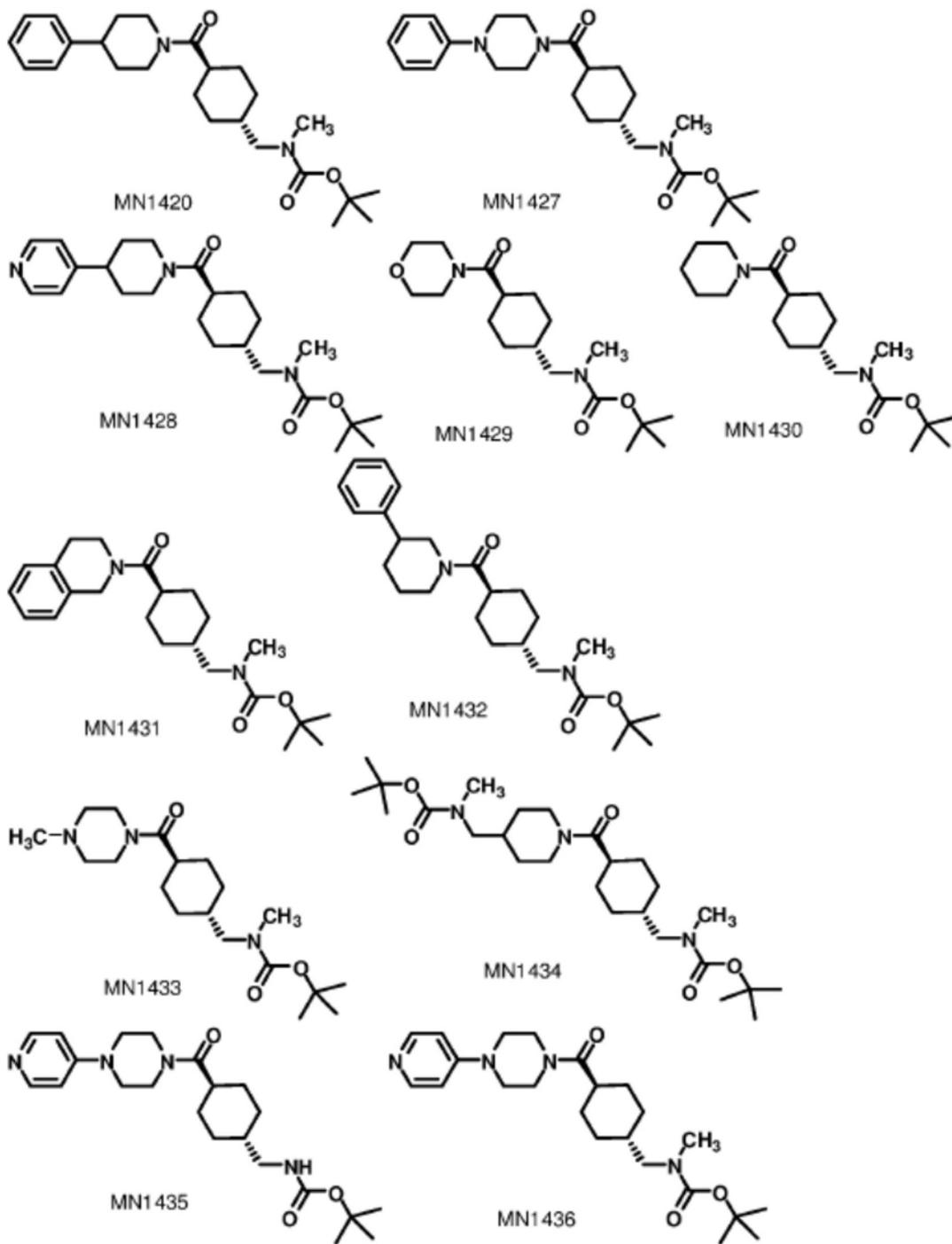
MN1322

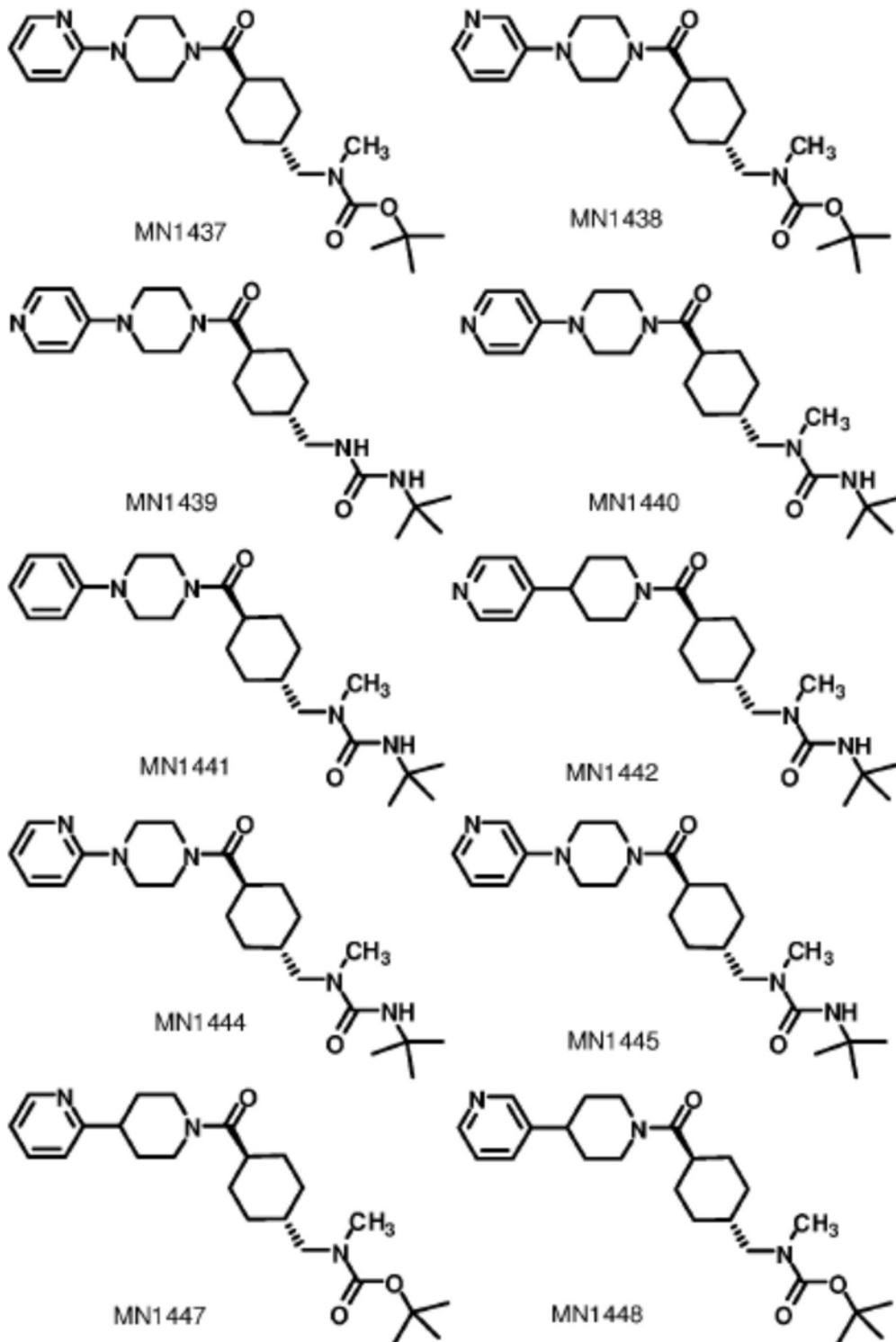


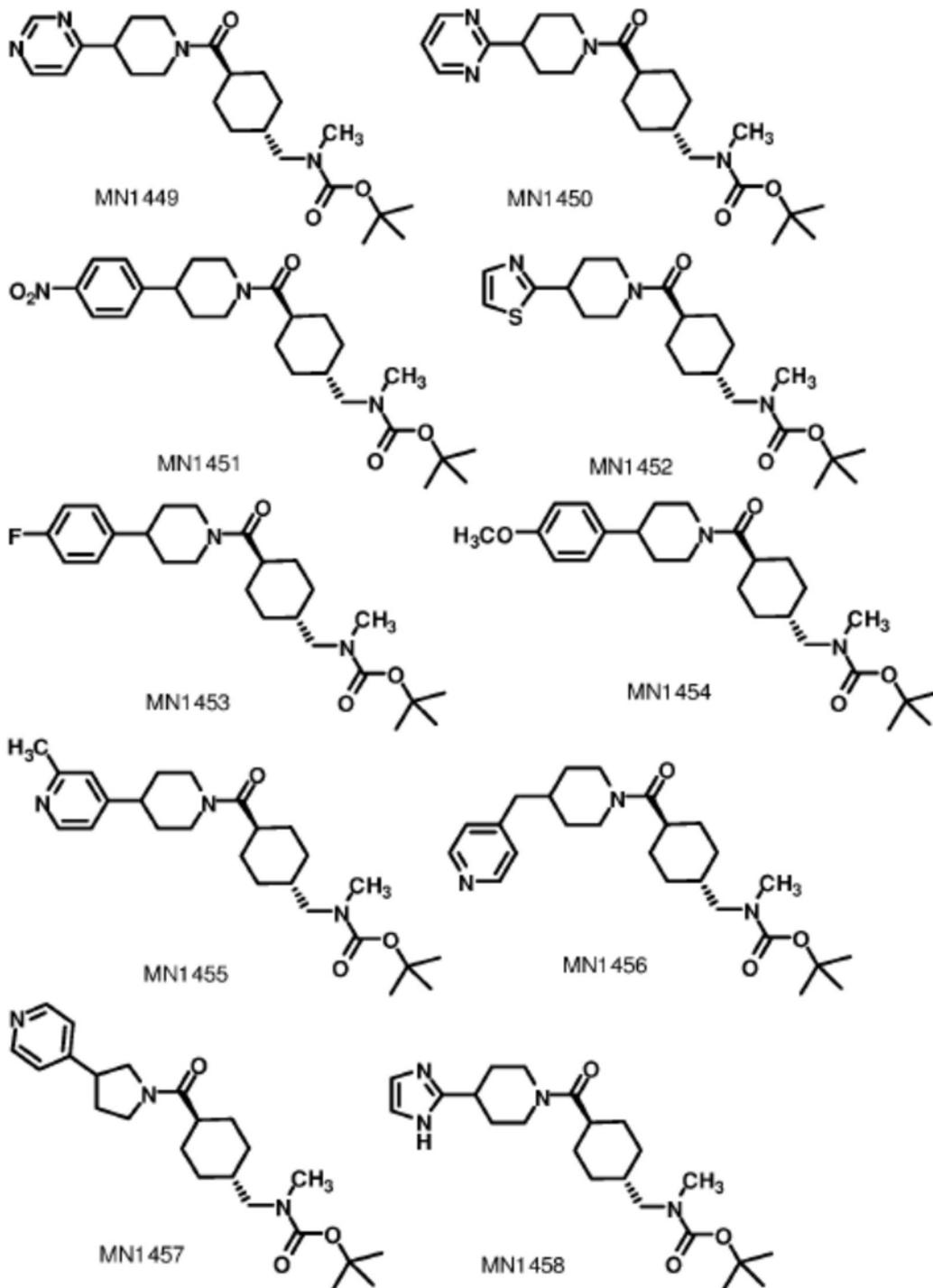


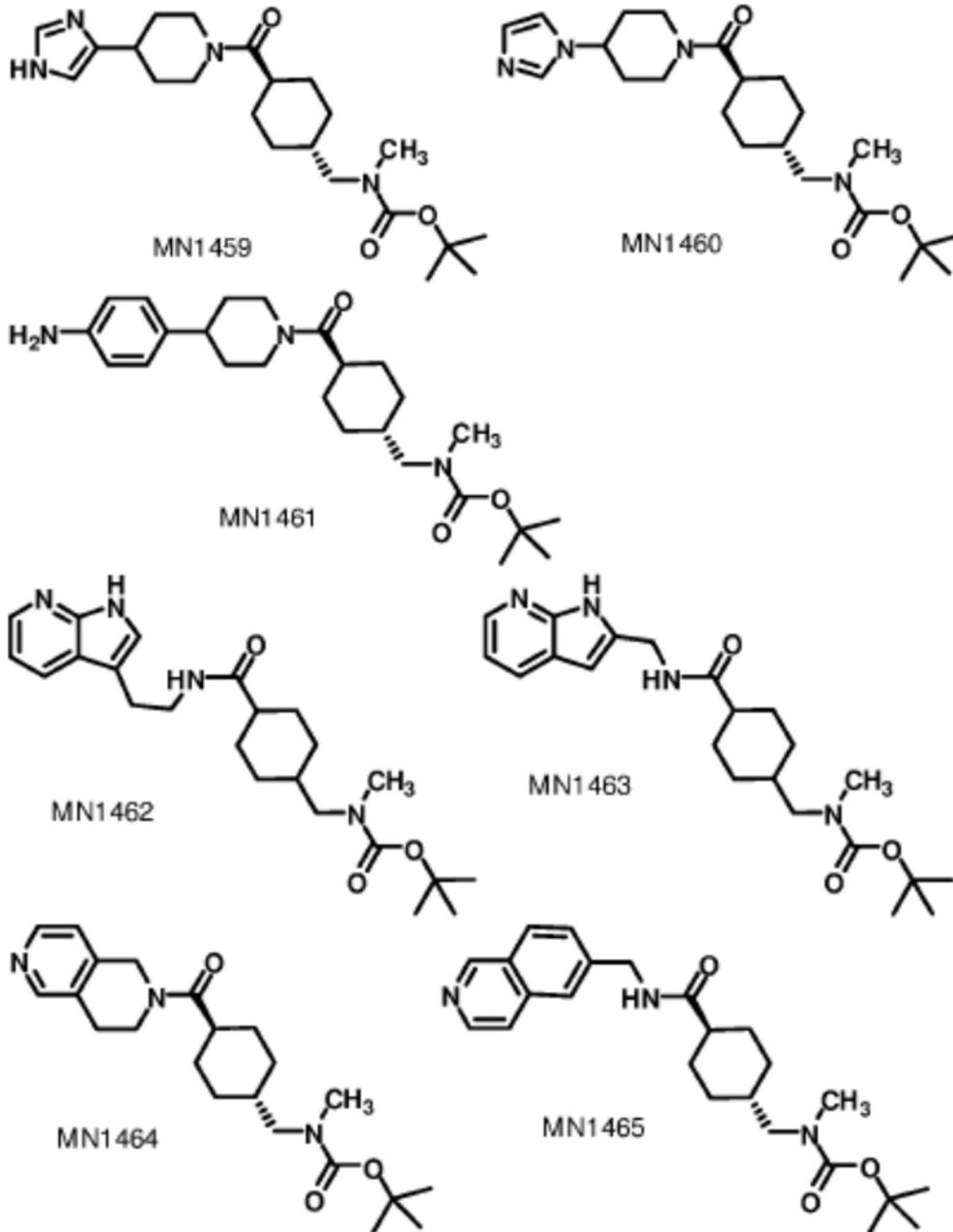


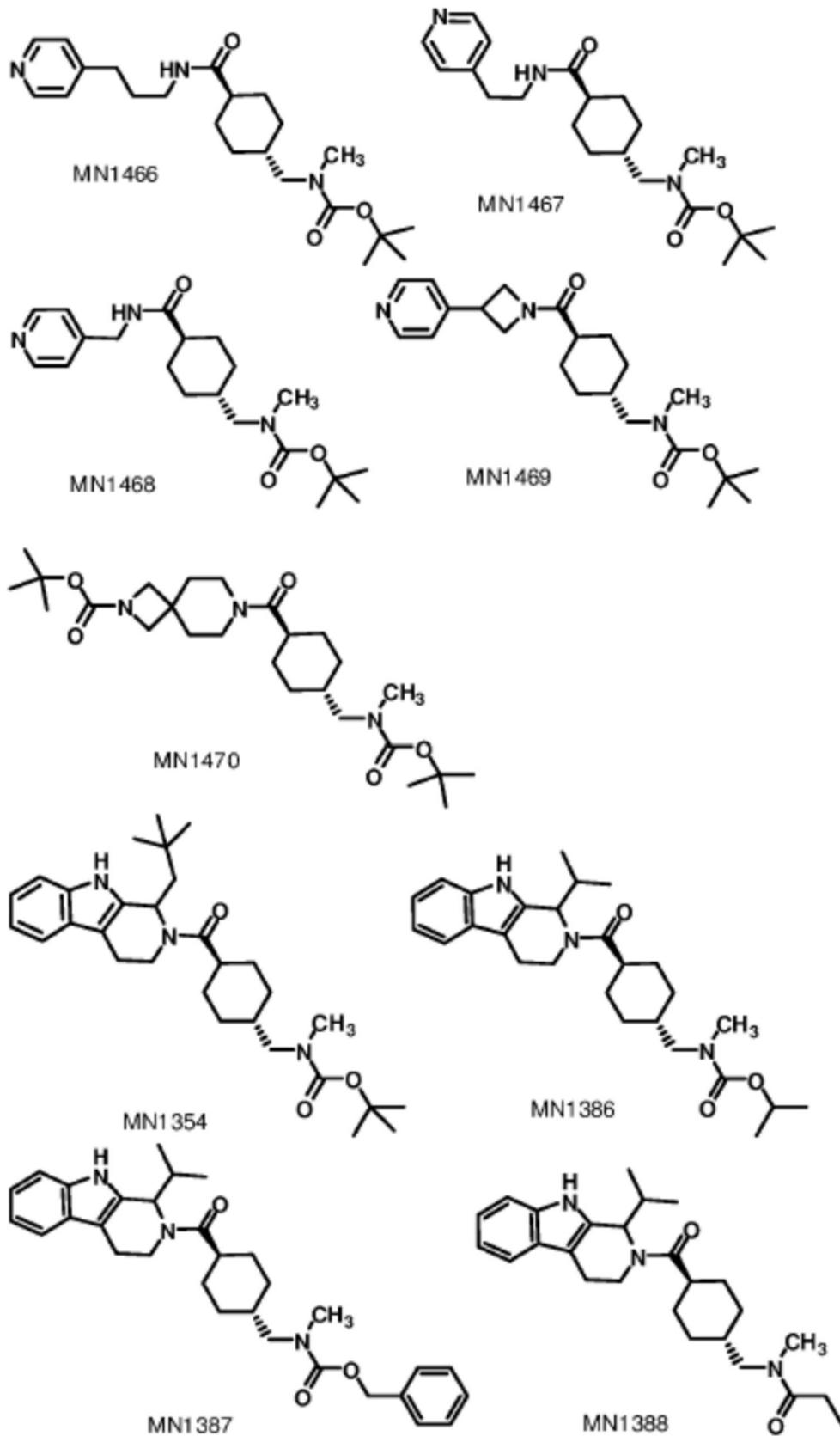


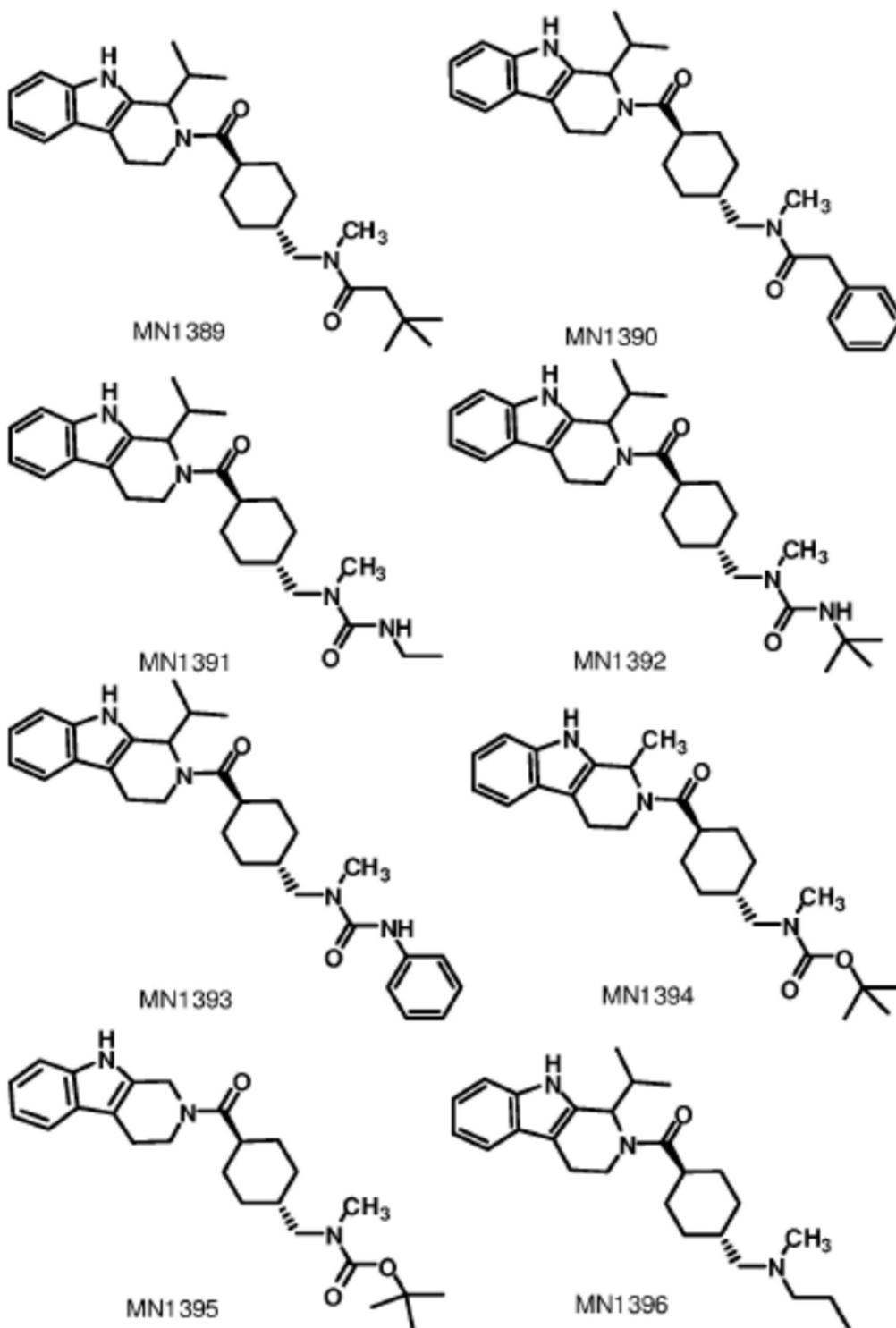


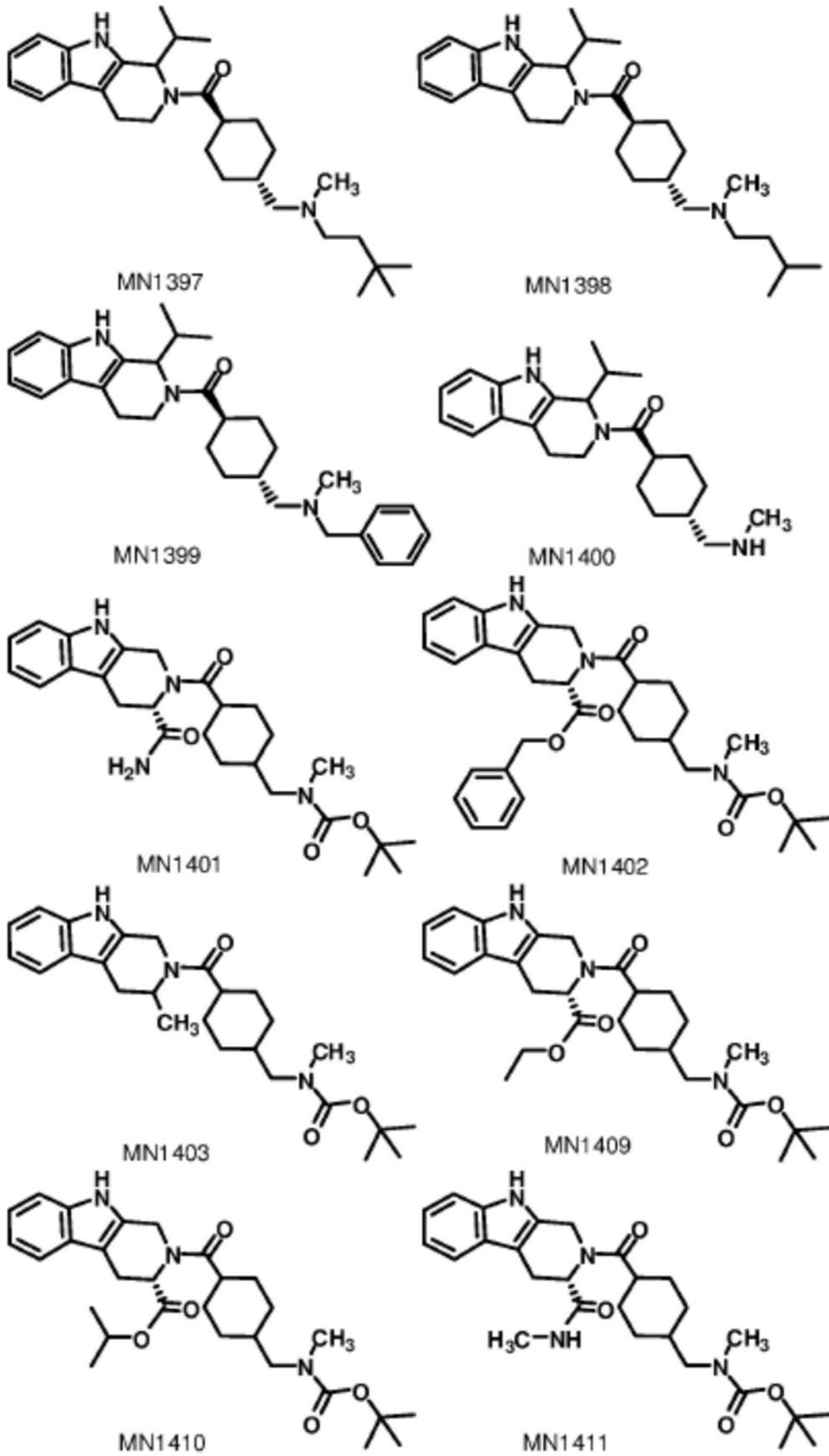


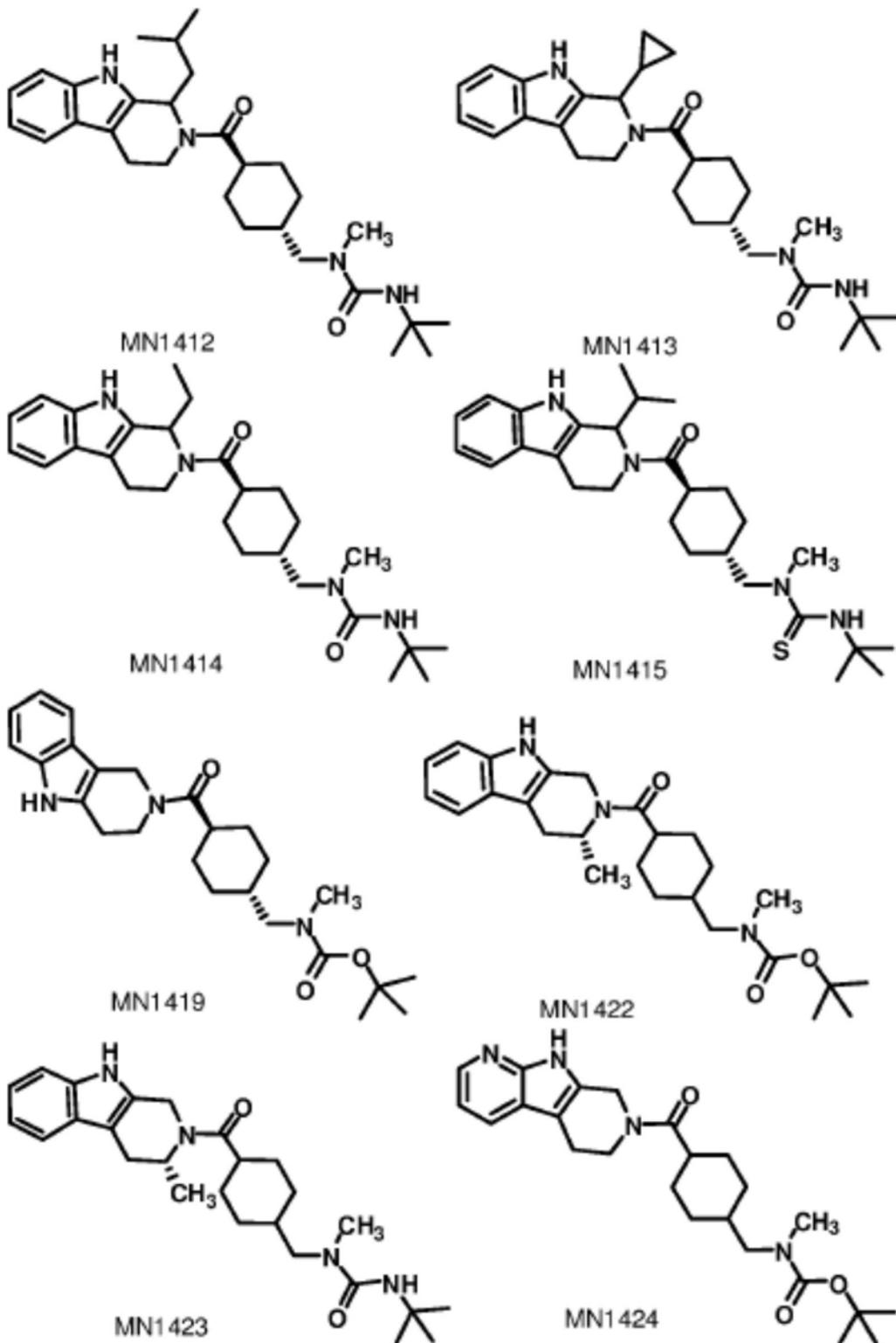


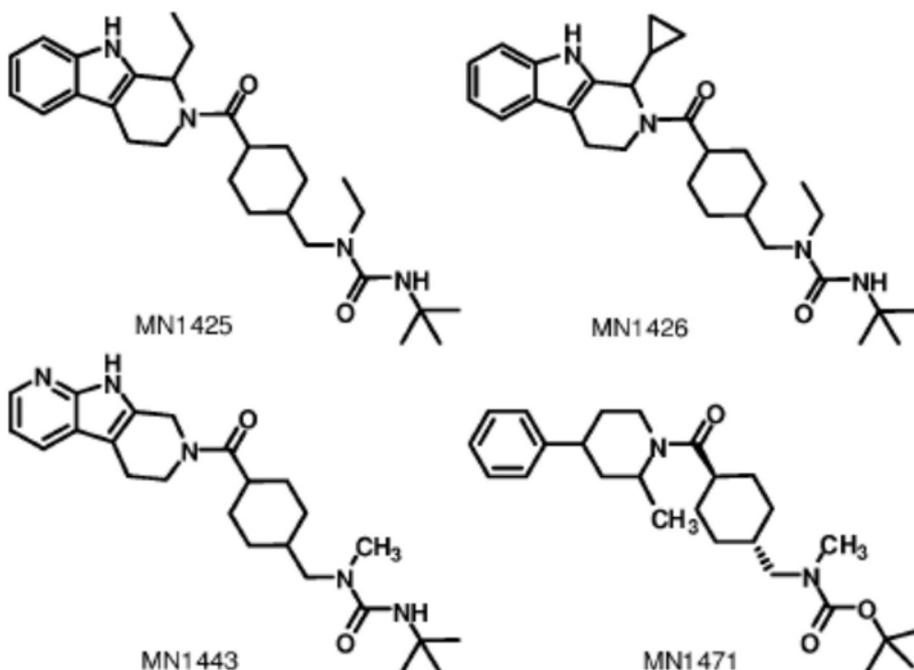












本文描述了用于治疗或预防癌症或癌症转移的化合物。在本文所述化合物的上下文中,应用以下定义:

在本说明书的上下文中,除非另有说明,否则“烷基”取代基或取代基中的烷基部分可以是线性或支化的,或者可以是或包括一个或多个环烷基。合适的烷基基团包括但不限于C1-C9烷基基团、C1-C6烷基基团、C1-C4烷基基团以及C1-C3烷基基团。烷基基团/部分的实例包括甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、2,4,4-三甲基戊基、2-甲基环戊基、环戊基甲基和环烷基基团/部分,如下例示。除非另有说明,否则所有烷基基团均可被取代或未被取代。

“烷基”是指不包含杂原子的烷基基团。因此,该表达包括直链烷基基团,例如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基等。该表达还包括直链烷基基团的支链异构体,包括但不限于以下以示例方式提供的: $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{H}(\text{CH}_3)$ 、 (CH_2CH_3) 、 $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ 和其他。

“卤素”或“卤代”是指氯、溴、氟和碘基团。术语“卤代烷基”是指被一个或多个卤素原子取代的烷基。术语“卤代烷氧基”是指被一个或多个卤素原子取代的烷氧基。

“卤代烷基”取代基或取代基中的卤代烷基部分是指其中一个或多个(例如一个、两个、三个、四个或五个)氢原子被卤素原子(即氯、溴、氟和碘原子)独立地取代的烷基基团或部分。合适的卤代烷基基团包括但不限于卤代(C1-C3)烷基和卤代(C1-C)烷基。卤代烷基基团/部分的实例包括氟甲基、二氟甲基、三氟甲基和2,2,2-三氟乙基。

“环烷基”取代基或取代基中的环烷基部分是指含有例如3至8个碳原子的饱和烃基环,其实例包括环丙基、环丁基、环戊基和环己基。除非另有说明,否则环烷基取代基或部分可包括单环、双环(例如稠环或螺环)和多环烃基环。“环烷基”取代基或取代基中的环烷基部

分包括环丙基、环丁基、环戊基和环己基。

“杂烷基”取代基或取代基中的杂烷基部分是指以下烷基基团或部分：其中1至4个仲或叔碳原子(包括该基团或部分通过其附接到分子的其余部分的任何仲或叔碳原子)是仲碳原子的情况下独立地被选自氮、氧和硫的杂原子取代；是叔碳原子的情况下被氮独立地取代。杂烷基基团/部分的实例包括甲氧基、甲氨基、甲基磺酰基、乙氧基、乙氨基、二甲氨基、乙基磺酰基、丙氧基、甲氧基乙基、丙氨基、甲基乙氨基、丙基磺酰基、甲基磺酰基乙基、四氢吡喃基氧基、N-甲基吡咯烷基和如下例示的杂环烷基基团/部分。

“杂环烷基”取代基或取代基中的杂环烷基部分是指以下环烷基基团或部分：其中1至4个仲或叔碳原子(包括该基团或部分通过其附接到分子的其余部分的任何仲或叔碳原子)是仲碳原子的情况下独立地被选自氮、氧和硫的杂原子取代；是叔碳原子的情况下被氮独立地取代。杂环烷基基团/部分的实例包括四氢呋喃基、吡咯烷基、四氢噻吩基、四氢吡喃基、哌啶基、哌嗪基、吗啉基和硫代吗啉基。

“烯基”取代基基团或取代基中的烯基部分是指具有一个或多个碳-碳双键的不饱和烷基基团或部分。合适的“烯基”包括但不限于C1-C9烯基、C1-C6烯基、C1-C4烯基和C1-C3烯基。烯基基团/部分的实例包括乙烯基、丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、1-戊烯基、1-己烯基、1,3-丁二烯基、1,3-戊二烯基、1,4-戊二烯基、1,4-己二烯基和如下例示的环烯基基团/部分。

“环烯基”取代基或取代基中的环烯基部分是指具有一个或多个碳-碳双键并且含有例如3至8个碳原子的不饱和烃基环，其实例包括环戊-1-烯-1-基、环己-1-烯-1-基和环己-1,3-二烯-1-基。除非另有说明，否则环烯基取代基或部分可以包括单环、双环(例如稠环或螺环)和多环烃基环。

“杂烯基”取代基或取代基中的杂烯基部分是指以下烯基基团或部分：其中1至4个仲或叔碳原子(包括该基团或部分通过其附接到分子的其余部分的任何仲或叔碳原子)是仲碳原子的情况下独立地被选自氮、氧和硫的杂原子取代；是叔碳原子的情况下被氮独立地取代。杂烯基基团/基团的实例包括乙烯氧基、乙烯基氨基、乙烯基磺酰基、乙烯氧基乙基和如下例示的杂环烯基基团/部分。

“杂环烯基”取代基或取代基中的杂环烯基部分是指以下环烯基基团或部分：其中1至4个仲或叔碳原子(包括该基团或部分通过其附接到分子的其余部分的任何仲或叔碳原子)是仲碳原子的情况下独立地被选自氮、氧和硫的杂原子取代；是叔碳原子的情况下被氮独立地取代。杂环烯基基团/部分的实例包括二氢吡喃基和二氢呋喃基。

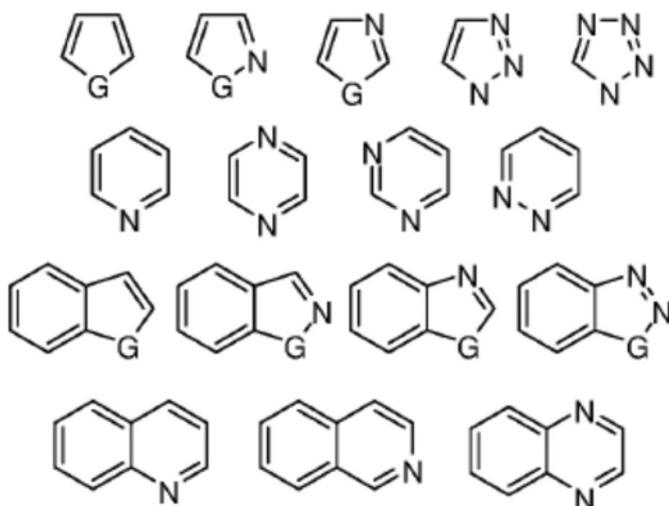
“炔基”取代基基团或取代基中的炔基部分是指具有一个或多个碳-碳三键的不饱和烷基基团或部分。炔基基团/部分的实例包括乙炔基、炔丙基、丁-1-炔基和丁-2-炔基。

“杂炔基”取代基或取代基中的杂炔基部分是指以下炔基基团或部分：其中1至4个仲或叔碳原子(包括该基团或部分通过其附接到分子的其余部分的任何仲或叔碳原子)是仲碳原子的情况下独立地被选自氮、氧和硫的杂原子取代；是叔碳原子的情况下被氮独立地取代。杂炔基基团/部分的实例包括乙炔氧基和炔丙基氨基。

“芳基”取代基或取代基中的芳基部分包括单环芳香烃和多环稠环芳香烃。芳基基团/部分的实例包括苯基、萘基、蒽基和菲基。

“杂芳基”取代基或取代基中的杂芳基部分包括单环芳香基团和多环稠环芳香基团，其

中1至4个环原子独立地选自氮、氧和硫,其余的环原子是碳。杂芳基基团/部分的实例包括以下:

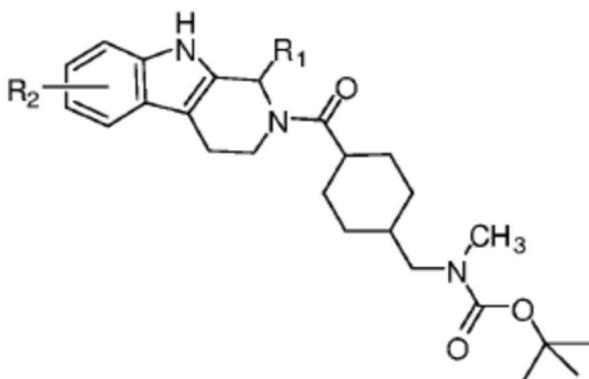


出于本发明的目的,部分的组合称为一个基团的情况下,例如,芳基烷基、芳基烯基、芳基炔基、烷基芳基、烯基芳基或炔基芳基,最后提及的部分包含该基团通过附接到分子的其余部分的原子。芳基烷基的实例是苄基。环烷基烷基的实例是环丙基甲基。

当有关称为一个基团的部分的组合使用前缀“杂”时,例如“杂(芳基烷基)”,组合内的任何或所有部分可以是杂部分。因此,术语“杂(芳基烷基)”涵盖杂芳基-烷基、芳基-杂烷基和杂芳基-杂烷基。杂(芳基烷基)基团/部分的实例包括吡啶基甲基、苯氧基、N-苯胺基和吡啶基氧基乙基。

在说明基团可以被取代的情况下,该基团可以被例如独立地选自以下的一个或多个取代:卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

一方面,本发明公开了具有式1的化合物:



R1是H、任选取代的C1-C6烷基;任选取代的C3-C4环烷基;任选取代的C2-C6烯基;任选取代的C1-C6烷氧基;任选取代的C6-C12芳基;具有1-4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基;任选取代的C7-C15芳基烷基,例如但不限于苄基或 α -甲基苄基;具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C2-C15杂芳基烷基;任选取代的C7-C15芳基烯基;任选取代的C3-C8环烷基;或任选取代的C4-C8环烷基烷基;

R2是氢、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基或乙氧基)、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙

基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H;

其中，“取代的”是指被独立地选自以下的一个或多个取代：卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-OCH₃、-OC₂H₅、-O-C1-C4烷基、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在一个实施例中，R1可以是C2-C4烷基或C3-C4环烷基。

在一个实施例中，R1可以是甲基。

在一个实施例中，R1可以是乙基、异丙基、环丙基或异丁基。

在一个实施例中，R1可以是乙基、异丙基、环丙基。

在一个实施例中，R2可以是H、卤素或甲基。

在一个实施例中，R2可以是H、F、C或Me。

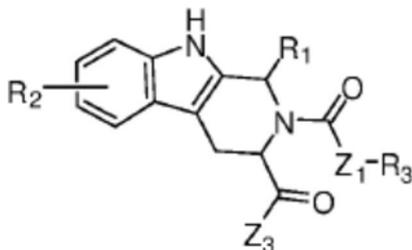
在一个实施例中，R2可以是H。

在一个实施例中，R1是乙基、异丙基、环丙基或异丁基，以及R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基（例如但不限于甲氧基和乙氧基）、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在另一个实施例中，R1是乙基、异丙基、环丙基或异丁基，以及R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基（例如但不限于甲氧基和乙氧基）、C1-C6烷基、-OH、-NH₂、-CN、-CHO、-COOH或-CONH₂。

在另一个实施例中，R1是乙基或异丙基或环丙基，以及R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基（例如但不限于甲氧基和乙氧基）或C1-C6烷基。

在一个方面，本发明公开了具有式2的化合物：



R1是H、任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C1-C6烷氧基；任选取代的C6-C12芳基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基；任选取代的C7-C15芳基烷基（例如但不限于苄基或 α -甲基苄基）；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C2-C15杂芳基烷基；任选取代的C7-C15芳基烯基；任选取代的C3-C8环烷基；或任选取代的C4-C8环烷基烷基；

R2是氢、C1-C6烷氧基（例如但不限于甲氧基或乙氧基）、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H；

Z1是键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH₃)-、-(CH₂)_n-、-C3-C7环烷基-CH₂-、-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO₂-或-C(=NH)-、-CH₂NH(CO)-、-CH₂NH(CO)O-、-CH₂NH(CO)NH-；-(CH₂)_nNH(CO)-、-(CH₂)_nNH(CO)O-；-(CH₂)_mNH(CO)NH-；-C3-C7环烷基-CH₂NH(CO)-、-C3-C7环烷基-CH₂NCH₃(CO)-、-C3-C7环烷基-CH₂NH(CO)O-、-C3-C7环烷基-CH₂NCH₃(CO)O-、-C3-C7环烷基-CH₂NH

(CO) NH-、-C3-C7环烷基-CH₂NCH₃ (CO) NH-、-(CH₂)_nN (CH₂CH₂C₆H₅)-或任选取代的C6-C12芳基；

Z3是-OH、-OCH₃、-O-C1-C6烷基、-O-CH₂C₆H₅、-NH₂、-NH (C1-C6烷基)、-N (C1-C6烷基) 2、-C1-C6烷基；

R3是H、任选取代的C1-C9烷基、C2-C6烯基；任选取代的C6-C12芳基、具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基；任选取代的C7-C15芳基烷基(例如但不限于苄基或 α -甲基苄基)；或任选取代的C3-C7环烷基；-(CH₂)_n-NH (CO) O- (C1-C6烷基)；-CH₂O (CH₂)_p-NH (CO) O- (C1-C6) 烷基；-(CH₂)_p-NHCO- (CH₂)_m-NH (CO) O-C1-C6烷基)；-NH (CO) O-叔丁基；-O-叔丁基；或-叔丁基；CONH-芳基；

$m=1-5$ ； $n=1-8$ ； $p=1-9$ ；

其中，“取代的”是指被独立地选自以下的一个或多个取代：卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-OCH₃、-OC₂H₅、-O-C1-C4烷基、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在一个实施例中，R1可以是H，C1-C4烷基(例如甲基、乙基、异丙基、异丁基)，苯基，卤素、甲基羧基、甲氧基、乙氧基、甲基取代的苯基；杂芳基、吡啶基、苄基或 α -甲基苄基。

在一个实施例中，R1可以是H或C2-C4烷基。

在一个实施例中，R1可以是H。

在一个实施例中，R2可以是H、卤素、甲基或甲氧基。

在一个实施例中，Z1可以是键、-NH-、-CH₂-、-(CH₂)₂-、-(CH₂)₃-、-CH=CH-、取代的苯基、-CH₂NH (CO) O-、-(CH₂)₂NH (CO) O-、-(CH₂)₃NH (CO) O-、-(CH₂)₄NH (CO) O-、-(CH₂)₅NH (CO) O-、-CH₂NH (CO) -、-CH (CH₃) NH (CO) O-、-CH₂NH (CO) NH-、-CH₂NH (CO) CH₂NH (CO) O-、-CH₂O (CH₂)₂NH (CO) O-或-环己基-CH₂NH (CO) O-。

在一个实施例中，Z3可以是-OH、-OCH₃、-O-C1-C6烷基、-NH₂、-N (C1-C6烷基) 2或-C1-C6烷基。

在一个实施例中，R3可以是乙基，丁基，异丁基，戊基，2,4,4-三甲基戊基，庚基，辛基，苯基，被甲基、乙基、卤素、乙氧基或甲氧基取代的苯基。

在一个实施例中，R1是异丁基，并且R3是-NH (CO) O-叔丁基，R2可以是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在一个实施例中，R1是异丁基，Z1是环己基甲基，R3是-NH (CO) O-叔丁基，R2可以是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在一个实施例中，R1是异丁基，Z1是C1-C5烷基，R3是-NH (CO) O-叔丁基或-NH (CO) CH₂-异丙基，R2可以是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

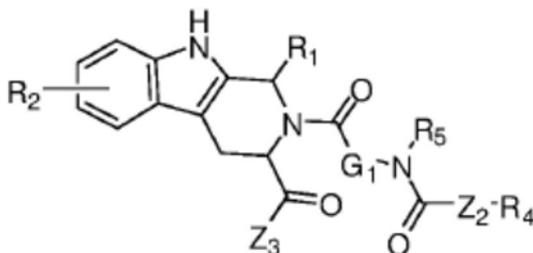
在一个实施例中，R1是异丁基，R3是-NH (CO) O-叔丁基，以及R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在一个实施例中,R1是乙基、异丁基、异丙基、苄基,Z1是(CH₂)₄₋₉,R3是-NH(CO)O-叔丁基,R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在一个实施例中,Z1是(CH₂)₄₋₉,R3是-NH(CO)O-叔丁基,R2可以是氢,R1是被氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H取代的苯环。

在一个实施例中,Z1是环己基甲基或C3-C7环烷基-CH₂-基团,R3是-NH(CO)O-叔丁基,R1是异丁基,R2是卤素、甲基或甲氧基。

在一个方面,本发明公开了具有式3的化合物:



R1是H、任选取代的C1-C6烷基;任选取代的C2-C6烯基;任选取代的C1-C6烷氧基;任选取代的C6-C12芳基;具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基;任选取代的C7-C15芳基烷基(例如但不限于苄基或 α -甲基苄基);具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C2-C15杂芳基烷基;任选取代的C7-C15芳基烯基;任选取代的未取代的C3-C8环烷基;或任选取代的C4-C8环烷基烷基;

R2是氢、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基或乙氧基)、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H;

G1是键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH₃)-、-(CH₂)_n-、-C3-C7环烷基、-C3-C7环烷基-CH₂-、-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO₂-或-C(=NH)-、-CH₂NH(CO)-、-CH₂NH(CO)O-、-CH₂NH(CO)NH-、-(CH₂)_nNH(CO)-、-(CH₂)_nNH(CO)O-、-(CH₂)_mNH(CO)NH-; -C3-C7环烷基-NH(CO)-、-C3-C7环烷基-CH₂NH(CO)O-、-C3-C7环烷基-NH(CO)NH-、-N(CH₂CH₂C₆H₅)-、-C3-C7环烷基-CH₂- (例如但不限于-环己基-CH₂-);

Z2是键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH₃)-、-(CH₂)_n-、-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO₂-或-C(=NH)-、-CH₂NH(CO)-、-CH₂NH(CO)O-、-CH₂NH(CO)NH-; -(CH₂)_pNH(CO)-、-(CH₂)_pNH(CO)O-、-(CH₂)_pNH(CO)NH-; -C3-C7环烷基-NH(CO)-、-C3-C7环烷基-NCH₃(CO)-、-C3-C7环烷基-CH₂NH(CO)O-、-C3-C7环烷基-CH₂NCH₃(CO)O-、-C3-C7环烷基-NH(CO)NH-、-C3-C7环烷基-NCH₃(CO)NH-、-N(CH₂CH₂C₆H₅)-;或任选取代的C6-C12芳基;

Z3是-OH、-OCH₃、-O-C1-C6烷基、-O-CH₂C₆H₅、-NH₂、-NH(C1-C6烷基)、-N(C1-C6烷基)₂、-C1-C6烷基;

R5是H、甲基或任选取代的C1-C6烷基;

R4是H、任选取代的C1-C9烷基(例如但不限于叔丁基);任选取代的C2-C6烯基;任选取代的C6-C12芳基(例如但不限于任选取代的萘基);具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基;任选取代的C7-C15芳基烷基(例如但不限于苄基或 α -甲基苄

基);任选取代的C3-C7环烷基;-(CH₂)_p-NH(CO)O-(C1-C6烷基);-CH₂O(CH₂)_p-NH(CO)O-(C1-C6)烷基;-(CH₂)_p-NHCO-(CH₂)_n-NH(CO)O-C1-C6烷基);-NH(CO)O-叔丁基;或-O-叔丁基;

m=1-5;n=1-8;p=1-9;

其中,“取代的”是指被独立地选自以下的一个或多个取代:卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基、乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-OCH₃、-OC₂H₅、-O-C1-C4烷基、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在一个实施例中,R1可以是氢,C1-C4烷基(如甲基、乙基、异丙基、异丁基),苄基,杂芳基(例如吡啶基、苯基)和被卤素、三氟甲基、甲氧基、氰基或二烷基氨基取代的苯基。

在一个实施例中,R1可以是H或C1-C4烷基。

在一个实施例中,R1可以是H。

在一个实施例中,R2可以是氢、卤素、甲基或甲氧基。

在一个实施例中,R2可以是H。

在一个实施例中,Z2可以是O、NH、-CH₂-、-(CH₂)₂-、-(CH₂)₃-、-(CH₂)₄-、-(CH₂)₅-、-CH(CH₃)-、-CH₂NH(CO)CH₂-、-CH₂O(CH₂)₂-、-环己基-CH₂-或键。

在一个实施例中,Z2可以是O。

在一个实施例中,Z3可以是-OH、-OCH₃、-O-C1-C6烷基、-NH₂、-N(C1-C6烷基)₂或-C1-C6烷基。

在一个实施例中,G1是(CH₂)₁-、-(CH₂)₂-、-(CH₂)₃-、-(CH₂)₄-、-(CH₂)₅-、-CH₂OCH₂CH₂-、-CH(CH₃)-、-CH₂NHCOCH₂-或-环己基-CH₂-。

在一个实施例中,G1是-环己基-CH₂-。

在一个实施例中,R5可以是氢、卤素、或2-苯基乙基。

在一个实施例中,R5是甲基。

在一个实施例中,R4可以是任选取代的苯基、萘基、苄基,取代的异丙基或叔丁基。

在一个实施例中,R4可以是C4烷基,如叔丁基。

在一个实施例中,Z2和R4一起是-O-C1-C4烷基,例如-O-C4烷基,如,-O-叔丁基。

在一个实施例中,R1是异丁基,R5是氢,Z2是氧以及R4是叔丁基,G1没有氧,R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在另一个实施例中,R1是异丁基,R5是氢,Z2是氧,R4是叔丁基,G1是环己基甲基,R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在另一个实施例中,R1是异丁基,R5是氢,Z2是氧或CH₂,R4是叔丁基或异丙基,G1是C1-C5亚烃基,R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在一个实施例中,R1是异丁基,R5是氢,Z2是氧,R4是叔丁基,以及R2可以是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

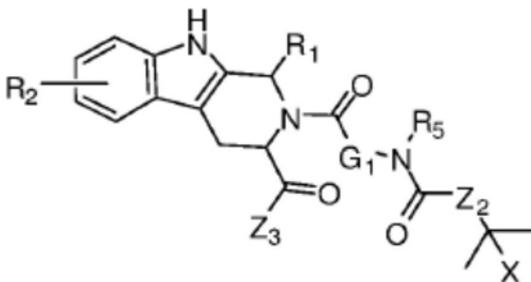
在一个实施例中,R1是乙基、异丁基、异丙基或苄基,R5是氢,Z2是氧,R4是叔丁基,G1是

(CH₂)₄₋₉-, R₂是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C₁-C₆烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C₁-C₆烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在一个实施例中, R₅是氢, Z₂是氧, R₄是叔丁基, G₁是(CH₂)₄₋₉-, R₂是氢, R₁是被氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C₁-C₆烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C₁-C₆烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H取代的苯环。

在另一个实施例中, R₅是氢, Z₂是氧, R₄是叔丁基, R₁是异丁基, R₂是卤素、甲基或甲氧基, G₁是环己基甲基或C₃-C₇环烷基-CH₂-基团。

在一个方面, 本发明公开了具有式4的化合物:



R₁是H、任选取代的C₁-C₆烷基;任选取代的C₂-C₆烯基;任选取代的C₁-C₆烷氧基;任选取代的C₆-C₁₂芳基;具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C₁-C₉杂芳基;任选取代的C₇-C₁₅芳基烷基(例如但不限于苄基或 α -甲基苄基);具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C₂-C₁₅杂芳基烷基;任选取代的C₇-C₁₅芳基烯基;任选取代的C₃-C₈环烷基;或任选取代的C₄-C₈环烷基烷基;

R₂是氢、C₁-C₆烷氧基(例如但不限于甲氧基或乙氧基)、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C₁-C₆烷基、OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H;

G₁是键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH₃)-、-(CH₂)_n-、-C₃-C₇环烷基、-C₃-C₇环烷基-CH₂-、-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO₂-或-C(=NH)-、-CH₂NH(CO)-、-CH₂NH(CO)O-、-CH₂NH(CO)NH-、-(CH₂)_nNH(CO)-、-(CH₂)_nNH(CO)O-、-(CH₂)_mNH(CO)NH-; -C₃-C₇环烷基-NH(CO)-、-C₃-C₇环烷基-CH₂NH(CO)O-、-C₃-C₇环烷基-NH(CO)NH-、-N(CH₂CH₂C₆H₅)-、-C₃-C₇环烷基-CH₂- (例如但不限于-环己基-CH₂-);

Z₂是键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH₃)-、-(CH₂)_n-; -CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO₂-或-C(=NH)-、-CH₂NH(CO)-、-CH₂NH(CO)O-、-CH₂NH(CO)NH-; -(CH₂)_pNH(CO)-、-(CH₂)_pNH(CO)O-、-(CH₂)_pNH(CO)NH-; -C₃-C₇环烷基-NH(CO)-、-C₃-C₇环烷基-CH₂NH(CO)O-、-C₃-C₇环烷基-NH(CO)NH-或-N(CH₂CH₂C₆H₅)-;

Z₃是-OH、-OCH₃、-O-C₁-C₆烷基、-OCH₂C₆H₅、-NH₂、-NH(C₁-C₆烷基)、-N(C₁-C₆烷基)₂、-C₁-C₆烷基;

R₅是H、甲基或任选取代的C₁-C₆烷基;

X是H、C₁-C₃烷基或C₁-C₃芳基烷基;

m=1-5; n=1-8; p=1-9;

其中, “取代的”是指被独立地选自以下的一个或多个取代: 卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C₁-C₆烷氧基、C₁-C₆烷基、-OH、-OCH₃、-OC₂H₅、-O-C₁-C₄烷基、-

SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在一个实施例中,R1可以是氢,甲基,乙基,异丙基,异丁基,苄基,杂芳基(例如吡啶基、苯基)和被卤素、甲基、三氟甲基、甲氧基、氰基或二烷基氨基取代的苯基。

在一个实施例中,R1可以是H或C1-C4烷基。

在一个实施例中,R1可以是H。

在一个实施例中,R2可以是氢、卤素、甲基或甲氧基。

在一个实施例中,R是H。

在一个实施例中,G1可以是-CH₂-、-(CH₂)₂-、-(CH₂)₃-、-(CH₂)₄-、-(CH₂)₅-、-CH₂OCH₂CH₂-、-CH(CH₃)-、-CH₂NHCOCH₂-、-CH₂O(CH₂)₂-、-环己基-CH₂-或键。在一个实施例中,G1是-环己基-CH₂-。

在一个实施例中,Z2可以是O、NH、-CH₂-或键。

在一个实施例中,Z2可以是O。

在一个实施例中,Z3可以是-OH、-OCH₃、-O-C1-C6烷基、-NH₂、-N(C1-C6烷基)₂或-C1-C6烷基。

在一个实施例中,Z3可以是C1-C4烷基。

在一个实施例中,Z3是甲基。

在一个实施例中,R5可以是氢或甲基。

在一个实施例中,R5是甲基。

在一个实施例中,X可以是氢或甲基。

在一个实施例中,X是甲基。

在一个实施例中,R1是异丁基,R5是氢,X是甲基,Z2是氧,G1是一条跨越4-9个键长并且没有氧原子的链,R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在另一个实施例中,R1是异丁基,R5是氢,X是甲基,Z2是氧,G1是环己基甲基,R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在另一个实施例中,R1是异丁基,R5是氢,X是甲基或氢,Z2是氧或CH₂,G1是C1-5亚甲基基团,R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

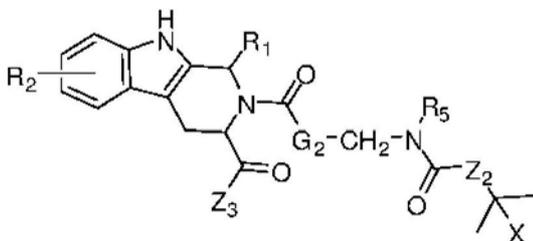
在另一个实施例中,R1是异丁基,R5是氢,X是甲基,Z2是氧,G1是4-9个键长的连接子(linker),以及R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在另一个实施例中,R1是乙基、异丁基、异丙基、苄基,R5是氢,X是甲基,Z2是氧,G1是(CH₂)₄₋₉,R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在一个实施例中, R5是氢, X是甲基, Z2是氧, G1是(CH₂)₄₋₉, R2是氢, R1是被氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H取代的苯环。

在另一个实施例中, R5是氢, X是甲基, Z2是氧, R1是异丁基, R2是卤素、甲基或甲氧基, G1是环己基甲基或C3-C7环烷基-CH₂-基团。

在一个方面, 本发明公开了具有式5的化合物:



R1是H、任选取代的C1-C6烷基;任选取代的C2-C6烯基;任选取代的C1-C6烷氧基;任选取代的C6-C12芳基;具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基;任选取代的C7-C15芳基烷基(例如但不限于苄基或 α -甲基苄基);具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C2-C15杂芳基烷基;任选取代的芳基烯基;任选取代的C3-C8环烷基;或任选取代的C4-C8环烷基烷基;

R2是氢、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基或乙氧基)、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H;

G2是键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH₃)-、-(CH₂)_n-、-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO₂-或-C(=NH)-、-CH₂NH(CO)-、-CH₂NH(CO)O-、-CH₂NH(CO)NH-;-(CH₂)_nNH(CO)-、-(CH₂)_nNH(CO)O-、-(CH₂)_mNH(CO)NH-; -C3-C7环烷基(例如但不限于-环己基-)或-N(CH₂CH₂C₆H₅)-;

Z2是键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH₃)-、-(CH₂)_n-; -CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO₂-或-C(=NH)-、-CH₂NH(CO)-、-CH₂NH(CO)O-、-CH₂NH(CO)NH-;-(CH₂)_pNH(CO)-、-(CH₂)_pNH(CO)O-、-(CH₂)_pNH(CO)NH-; -C3-C7环烷基-NH(CO)-、-C3-C7环烷基-CH₂NH(CO)O-、-C3-C7环烷基-NH(CO)NH-或-N(CH₂CH₂C₆H₅)-;

Z3是-OH、-OCH₃、-O-C1-C6烷基、-OCH₂C₆H₅、-NH₂、-NH(C1-C6烷基)、-N(C1-C6烷基)₂、-C1-C6烷基;

R5是H、甲基或任选取代的C1-C6烷基;

X是H、C1-C3烷基或C1-C3芳基烷基;

m=1-5;n=1-8;p=1-9;

其中,“取代的”是指被独立地选自以下的一个或多个取代:卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-OCH₃、-OC₂H₅、-O-C1-C4烷基、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在一个实施例中, R1可以是氢, C1-C4烷基(如甲基、乙基、异丙基、异丁基), 苄基, 杂芳基(例如吡啶基、苯基), 被卤素、三氟甲基、甲基、甲氧基、氰基或二烷基氨基取代的苯基。

在一个实施例中, R1可以是H或C1-C4烷基。

在一个实施例中, R1可以是H。

在一个实施例中, R2可以是氢、卤素、甲基或甲氧基。

在一个实施例中,R2是H。

在一个实施例中,G2可以是键、-(CH₂)₁-、-(CH₂)₂-、-(CH₂)₃-、-(CH₂)₄-、-CH₂OCH₂-、-CH(CH₃)-、-CH₂NHCO-或-环己基-。

在一个实施例中,G2是环己基。

在一个实施例中,Z2是O、CH₂或NH。

在一个实施例中,Z2是O。

在一个实施例中,Z3可以是-OH、-OCH₃、-O-C₁-C₆烷基、-NH₂、-N(C₁-C₆烷基)₂或-C₁-C₆烷基。

在一个实施例中,Z3是C₁-C₄烷基。

在一个实施例中,Z3是甲基。

在一个实施例中,R5可以是氢或甲基。

在一个实施例中,R5是甲基。

在一个实施例中,X可以是氢或甲基。

在一个实施例中,X是甲基。

在一个实施例中,R1是异丁基,R5是氢,Z2是氧,R5是氢,X是甲基,G2没有氧,R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C₁-C₆烷氧基、C₁-C₆烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在另一个实施例中,R1是异丁基,R5是氢,X是甲基,Z2是氧,G2是环己基,R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C₁-C₆烷氧基、C₁-C₆烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在另一个实施例中,R1是异丁基,Z2是氧或CH₂,R5是氢或甲基,X是甲基,G2键或-(CH₂)₁₋₄-、R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C₁-C₆烷氧基(例如甲氧基和乙氧基)、C₁-C₆烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

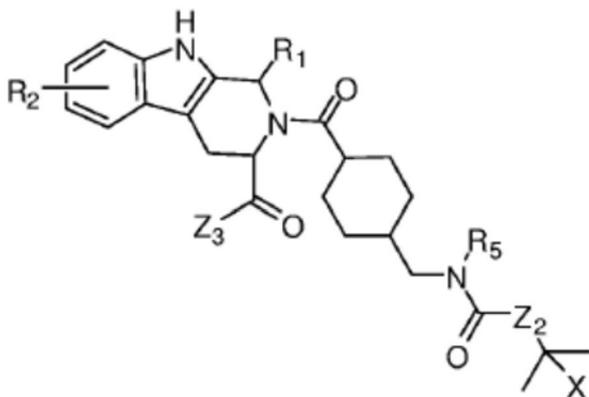
在另一个实施例中,R1是异丁基,Z2是氧,R5是氢,X是甲基,以及R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C₁-C₆烷氧基、C₁-C₆烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在另一个实施例中,R1是乙基、异丁基、异丙基、苄基,Z2是氧,R5是氢,X是甲基,G2是(CH₂)₂₋₅,R2可以是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C₁-C₆烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C₁-C₆烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在另一个实施例中,R5是氢,X是甲基,Z2是氧,G2是(CH₂)₂₋₅,R2是氢,R1是被氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C₁-C₆烷氧基、C₁-C₆烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H取代的苯环。

在另一个实施例中,R5是氢,X是甲基,Z2是氧,R1是异丁基,R2是卤素、甲基或甲氧基,G2是环己基或C₃-C₇环烷基-CH₂-基团。

在一个方面,本发明公开了具有式6的化合物:



R1是H、任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C1-C6烷氧基；任选取代的C6-C12芳基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基；任选取代的C7-C15芳基烷基（例如但不限于苄基或 α -甲基苄基）；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C2-C15杂芳基烷基；任选取代的C7-C15芳基烯基；任选取代的C3-C8环烷基；或任选取代的C4-C8环烷基烷基；

R2是氢、C1-C6烷氧基（例如但不限于甲氧基或乙氧基）、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H；

R5是H、甲基或任选取代的C1-C6烷基；

X是H、C1-C3烷基或C1-C3芳基烷基；

Z2是键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH₃)-、-(CH₂)_n-、-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO₂-、-C(=NH)-、-CH₂NH(CO)-、-CH₂NH(CO)O-、-CH₂NH(CO)NH-；-(CH₂)_nNH(CO)-、-(CH₂)_nNH(CO)O-、-(CH₂)_mNH(CO)NH-；-C3-C7环烷基-NH(CO)-、-C3-C7环烷基-CH₂NH(CO)O-、-C3-C7环烷基-NH(CO)NH-或-N(CH₂CH₂C₆H₅)-；

Z3是-OH、-OCH₃、-O-C1-C6烷基、-OCH₂C₆H₅、-NH₂、-NH(C1-C6烷基)、-N(C1-C6烷基)₂、-C1-C6烷基；

m=1-5；n=1-8；

其中，“取代的”是指被独立地选自以下的一个或多个取代：卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-OCH₃、-OC₂H₅、-O-C1-C4烷基、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在一个实施例中，R1可以是异丙基或异丁基。

在一个实施例中，R1是H。

在一个实施例中，R2可以是H、卤素或甲基。

在一个实施例中，R2是H。

在一个实施例中，R5可以是H。

在一个实施例中，X可以是甲基。

在一个实施例中，Z2可以是O。

在一个实施例中，Z3可以是-OH、-OCH₃、-O-C1-C6烷基、-NH₂、-N(C1-C6烷基)₂或-C1-C6烷基。

在一个实施例中，Z3可以是C1-C4烷基。

在一个实施例中,Z3是甲基。

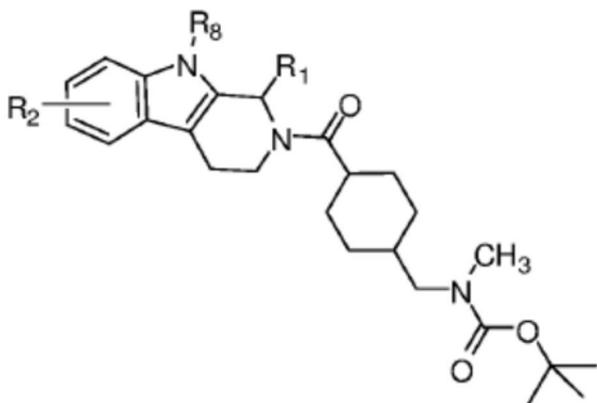
在一个实施例中,R1是异丁基,R5是氢,Z2是氧,X是氢,以及R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在另一个实施例中,R1是异丙基,R5是氢,Z2是氧,R4是叔丁基,以及R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在另一个实施例中,R1是异丁基或异丙基,R5是氢或甲基,Z2是氧,X是氢,以及R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在另一个实施例中,R1是异丁基或异丙基,R5是氢,Z2是-CH₂-或氧,X是氢或CH₃,以及R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在一个方面,本发明公开了具有式7的化合物:



R1是H、任选取代的C1-C6烷基;C3-C4环烷基;任选取代的C2-C6烯基;任选取代的C1-C6烷氧基;任选取代的C6-C12芳基;具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基;任选取代的C7-C15芳基烷基(例如但不限于苄基或 α -甲基苄基);具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C2-C15杂芳基烷基;任选取代的C7-C15芳基烯基;任选取代的C3-C8环烷基;或任选取代的C4-C8环烷基烷基;

R2是氢、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基或乙氧基)、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H;

R8是H、任选取代的C1-C6烷基;C3-C4环烷基;任选取代的C2-C6烯基;任选取代的C1-C6烷氧基;任选取代的C6-C12芳基;具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基;任选取代的C7-C15芳基烷基(例如但不限于苄基或 α -甲基苄基);具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C2-C15杂芳基烷基;任选取代的C7-C15芳基烯基;任选取代的C3-C8环烷基;或任选取代的C4-C8环烷基烷基;

其中,“取代的”是指被独立地选自以下的一个或多个取代:卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-OCH₃、-OC₂H₅、-O-C1-C4烷基、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在一个实施例中,R1可以是C2-C4烷基或C3-C4环烷基。

在一个实施例中,R1可以是乙基、异丙基或异丁基。

在一个实施例中,R1可以是乙基或异丙基。

在一个实施例中,R2可以是H、卤素或甲基。

在一个实施例中,R2可以是H、F、C或Me。

在一个实施例中,R2是H。

在一个实施例中,R8是H。

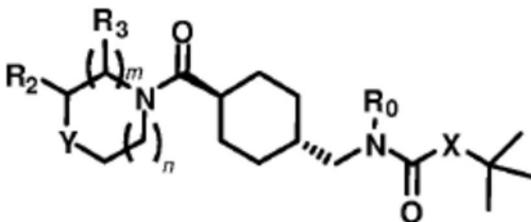
在一个实施例中,R8是Me。

在一个实施例中,R1是乙基、异丙基或异丁基,以及R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在另一个实施例中,R1是乙基、异丙基或异丁基,R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-NH₂、-CN、-CHO、-COOH或-CONH₂。

在另一个实施例中,R1是乙基或异丙基,以及R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)或C1-C6烷基。

在一个方面,本发明公开了具有式8的化合物:



其中,X是O、NH、S或CH₂;

Y是O、N-R1、N-CH₂-R1、CH-R1或CH-CH₂-R1;

R0是H或C1-C5烷基

R1是H、C1-5烷基、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基;

R2是H或任选取代的芳基;

R3是H或C1-3烷基;

m是0或1;以及

n是0或1;

其中,“取代的”是指被独立地选自以下的一个或多个取代:卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-OCH₃、-OC₂H₅、-O-C1-C4烷基、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在一些实施例中,X可以是O。替代地,X可以是CH₂。

在一些实施例中,Y可以是O、N-R1或CH-R1。在一些实施例中,Y可以是N-R1。替代地,Y可以是CH-R1。

在一些实施例中,R0是H或甲基。

在一些实施例中,R1是H、任选取代的芳基或任选取代的杂芳基;以及R2是H。替代地,R1可以是H,以及R2是任选取代的芳基。

在R1和R2的上下文中,术语“任选取代的芳基”可以指苯基或取代的苯基。取代的芳基或苯基可以指被选自以下的一个或多个(如1-3个或1-2个)取代的芳基或苯基:卤素、甲氧基、甲基、氨基和硝基。

在R1的上下文中,术语“任选取代的杂芳基”可以指任选取代的吡啶基、噻唑基、咪唑基或嘧啶基。杂芳基可以被选自以下的一个或多个(如1-3个或1-2个)取代:卤素、甲氧基、甲基、氨基和硝基。

在一些实施例中,R1是甲基、苯基、4-吡啶基、3-吡啶基、2-吡啶基、4-氨基苯基、4-氟苯基、4-甲氧基苯基、4-吡啶基、3-吡啶基、2-吡啶基、4-嘧啶基、4-硝基苯基、2-噻唑基、4-(2-甲基)吡啶基、2-咪唑基、4-咪唑基或1-咪唑基

在一些实施例中,R3是H或甲基。

在一个实施例中,Y是N-R1;R0是CH₃;X是O或NH;R1是苯基、甲基或吡啶基(例如4-吡啶基、3-吡啶基或2-吡啶基);R2是H;R3是H;m是1;以及n是1。

在一个实施例中,Y是CH-R1;R0是CH₃;X是O或NH;R1是苯基,被卤素、氨基、甲氧基或硝基取代的苯基(例如4-氨基苯基、4-氟苯基、4-甲氧基苯基和4-硝基苯基),吡啶基(例如4-吡啶基、3-吡啶基、2-吡啶基),嘧啶基(例如4-嘧啶基),2-噻唑基,4-(2-甲基)吡啶基,4-吡啶基甲基,2-咪唑基,4-咪唑基或1-咪唑基;R2是H;R3是H;m是1;以及n是0或1。

在一个实施例中,Y是O;R0是CH₃;X是O;R2是H;R3是H;m是1;以及n是1。

在一个实施例中,Y是CH-R1;R0是CH₃;X是O;R1是H;R2是H;R3是H;m是1;以及n是1。

如本文例示,式8的化合物可以选自MN1420、MN1427、MN1428、MN1429、MN1430、MN1432、MN1433、MN1434、MN1435、MN1436、MN1437、MN1438、MN1439、MN1440、MN1441、MN1442、MN1444、MN1445、MN1447、MN1448、MN1449、MN1450、MN1451、MN1452、MN1453、MN1454、MN1455、MN1456、MN1457、MN1458、MN1459、MN1460或MN1461。

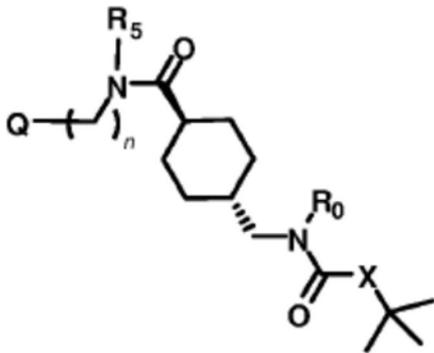
在一个实施例中,Y是N-R1;X是O;R0是H或CH₃;R1是苯基、甲基、4-吡啶基、3-吡啶基或2-吡啶基;R2是H;R3是H;m是1;以及n是1。

在一个实施例中,Y是N-R1;X是NH;R0是H或CH₃;R1是苯基、2-吡啶基或3-吡啶基;R2是H;R3是H;m是1;以及n是1。

在一个实施例中,Y是CH-R1;X是NH;R0是CH₃;R1是4-吡啶基或2-吡啶基;R2是H;R3是H;n是1;以及m是1。

在一个实施例中,Y是CH-R1;X是O;R0是CH₃;R1是苯基、4-吡啶基、H、叔丁基-CON(CH₃)-CH₂-、3-吡啶基,4-嘧啶基、2-嘧啶基、4-硝基苯基、2-噻唑基、3-氟苯基、4-甲氧基苯基、4-(2-甲基)吡啶基、4-吡啶基甲基、4-吡啶基、2-咪唑基、4-咪唑基、1-咪唑基或4-氨基苯基。

在一个方面,本发明公开了具有式9的化合物:



其中, Q为杂芳基;

R₀是H或C₁-4烷基;

X是O、NH、CH₂;

R₅是H或CH₃;以及

n是1、2或3。

在一些实施例中, Q可以是单环或双环杂芳基。例如, Q可以是含有1-2个氮原子的单环或双环杂芳基。Q可以是吡啶、异喹啉、吲哚或氮杂吲哚。

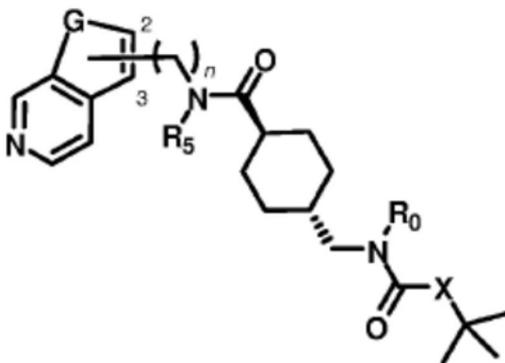
在一些实施例中, R₀可以是H或CH₃。例如, R₀可以是CH₃。

在一个实施例中, X是O。

在一个实施例中, R₅是H。

如本文例示, 式9的化合物可以选自MN1462、MN1463、MN1465、MN1468、MN1467和MN1466。

在一个方面, 本发明公开了具有式10的化合物:



其中, R₀是H或C₁-4烷基;

X是O、NH或CH₂;

R₅是H或C₁-4烷基;

G是NH、-CH=CH-、O或S;以及

n是1或2。

为了说明目的, 杂环部分在位置2或3处连接。

在一些实施例中, R₀是H或CH₃。例如, R₀可以是CH₃。

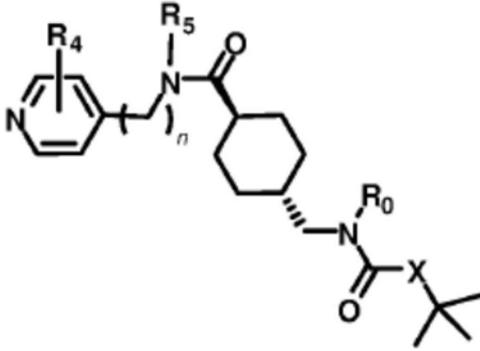
在一个实施例中, X是O。

在一些实施例中, R₅是H或CH₃。例如, R₅可以是H。

在一些实施例中, G是NH是-CH=CH-。

如本文例示, 式10的化合物可以选自MN1462、MN1463和MN1465。

在一个方面,本发明公开了具有式11的化合物:



其中,R0是H或C1-4烷基;

X是O、CH₂或NH;

R4是H、CH₃、OH、NH₂;

R5是H或C1-4烷基;以及

n是1-3。

在一些实施例中,R0是H或CH₃。例如,R0是CH₃。

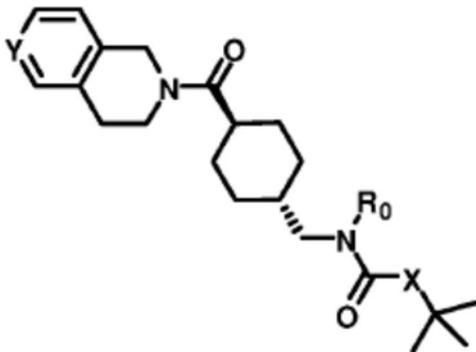
在一些实施例中,X是O。

在一些实施例中,R5是H或CH₃。例如,R5可以是H。

在一些实施例中,R4是H。

如本文例示,式11的化合物可以选自MN1468、MN1467和MN1466。

在一个方面,本发明公开了具有式12的化合物:



其中,R0是H或C1-4烷基;

X是O、NH或CH₂;以及

Y是N或CH。

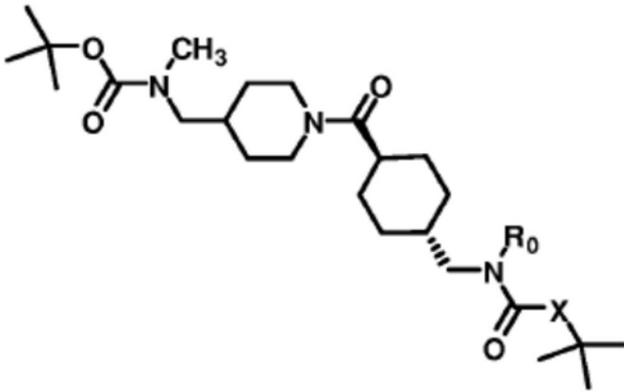
在一些实施例中,R0是H或CH₃。例如,R0是CH₃。

在一些实施例中,X是O。

在一些实施例中,Y是CH或N。

如本文例示,式12的化合物可以选自MN1431和MN1464。

在一个方面,本发明公开了具有式13的化合物:



其中, R0是H或C1-4烷基; 以及
X是O、NH或CH2。

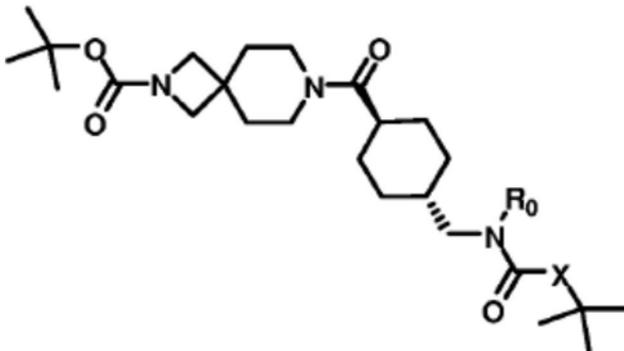
在一些实施例中, R0是H或CH3。例如, R0是CH3。

在一些实施例中, X是O。

在一个实施例中, R0是CH3以及X是O。

如本文例示, 式13的化合物是MN1434。

在一个方面, 本发明公开了具有式14的化合物:



其中, R0是H或C1-4烷基; 以及
X是O、NH或CH2。

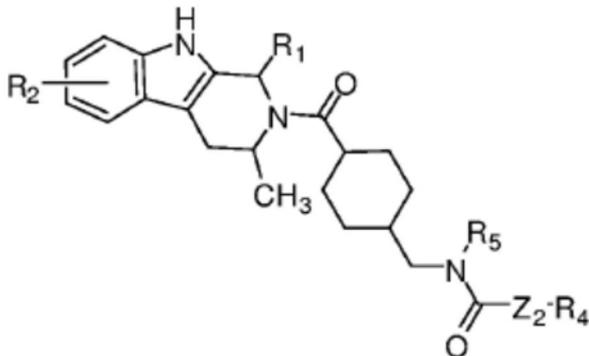
在一些实施例中, R0是H或CH3。例如, R0是CH3。

在一些实施例中, X是O。

在一个实施例中, R0是CH3; 以及X是O。

如本文例示, 式14的化合物是MN1460。

在一个方面, 本发明公开了具有式15的化合物:



R1是H、任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C1-C6烷氧基；任选取代的C6-C12芳基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基；任选取代的C7-C15芳基烷基（例如但不限于苄基或 α -甲基苄基）；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C2-C15杂芳基烷基；任选取代的C7-C15芳基烯基；任选取代的C3-C8环烷基；或任选取代的C4-C8环烷基烷基；

R2是氢、C1-C6烷氧基（例如但不限于甲氧基或乙氧基）、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H；

R5是H、甲基、乙基、C1-C6烷基、C1-C3芳基烷基或2-苯乙基；

Z2是键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH₃)-、-CH₂-、-(CH₂)_n-、-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO₂-、-C(=NH)-、-CH₂NH(CO)-、-CH₂NH(CO)O-、-CH₂NH(CO)NH-；-(CH₂)_nNH(CO)-、-(CH₂)_mNH(CO)O-、-(CH₂)_mNH(CO)NH-；

R4是H、任选取代的C1-C9烷基（例如但不限于叔丁基）；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C6-C12芳基（例如但不限于任选取代的苯基）；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基；任选取代的C7-C15芳基烷基（例如但不限于苄基或 α -甲基苄基）；-O-叔丁基；

m=1-5；n=1-8；

其中，“取代的”是指被独立地选自以下的一个或多个取代：卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在一个实施例中，R1可以是异丙基或异丁基。

在一个实施例中，R1可以是H。

在一个实施例中，R2可以是H、卤素或甲基。

在一个实施例中，R5可以是H或CH₃。例如，R5是CH₃。

在一个实施例中，R4是叔丁基。

在一个实施例中，Z2可以是O。

在一个实施例中，Z2可以是-NH-。

在一个实施例中，R1是异丁基，R5是氢，Z2是氧，R4是叔丁基，

以及R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基（例如但不限于甲氧基和乙氧基）、C1-C6烷基、OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在另一个实施例中，R1是异丙基，R5是氢，Z2是氧，R4是叔丁基。

在另一个实施例中，R1是H，以及R5是CH₃。例如，R1可以是H；R5可以是CH₃；R2可以是H、卤素或甲基；Z2可以是-O-或-NH-；以及R4可以是C4烷基（例如叔丁基）。

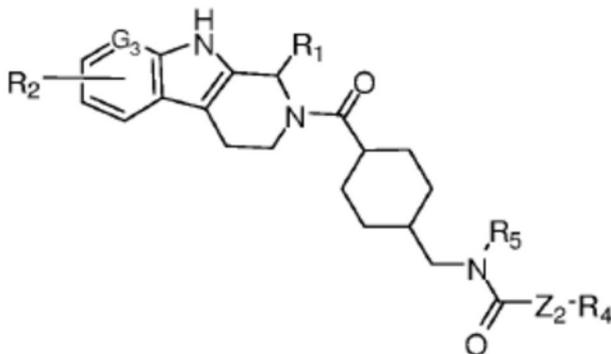
，以及R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基（例如但不限于甲氧基和乙氧基）、C1-C6烷基、OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在另一个实施例中，R1是异丁基或异丙基，R5是氢或甲基，Z2是氧，R4是叔丁基，以及R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基（例如但不限于甲氧基和乙氧基）、

C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在另一个实施例中，R₁是异丁基或异丙基，R₅是氢，Z₂是-CH₂-或氧，R₄是叔丁基或CH₃，以及R₂是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在一个方面，本发明公开了具有式16的化合物：



G₃是CH或N；

R₁是H、任选取代的C1-C6烷基；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C1-C6烷氧基；任选取代的C6-C12芳基；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基；任选取代的C7-C15芳基烷基(例如但不限于苄基或 α -甲基苄基)；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C2-C15杂芳基烷基；任选取代的C7-C15芳基烯基；任选取代的C3-C8环烷基；或任选取代的C4-C8环烷基烷基；

R₂是氢、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基或乙氧基)、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H；

R₅是甲基、乙基、C1-C6烷基、C1-C3芳基烷基或2-苯乙基；

Z₂是键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH₃)-、-CH₂-、-(CH₂)_n-、-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO₂-、-C(=NH)-、-CH₂NH(CO)-、-CH₂NH(CO)O-、-CH₂NH(CO)NH-；-(CH₂)_nNH(CO)-、-(CH₂)_nNH(CO)O-、-(CH₂)_mNH(CO)NH-；

R₄是H、任选取代的C1-C9烷基(例如但不限于叔丁基)；任选取代的C2-C6烯基；任选取代的C6-C12芳基(例如但不限于任选取代的苯基)；具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基；任选取代的C7-C15芳基烷基(例如但不限于苄基或 α -甲基苄基)；-O-叔丁基；

m=1-5；n=1-8；

其中，“取代的”是指被独立地选自以下的一个或多个取代：卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在一个实施例中，G₃可以是H或N。

在一个实施例中，R₁可以是C1-4烷基，例如但不限于甲基、乙基、丙基、丁基和环丙基。

在一个实施例中，R₁可以是异丙基或异丁基。

在一个实施例中，R₁可以是甲基。

在一个实施例中，R₁可以是乙基。

在一个实施例中,R1可以是环丙基。

在一个实施例中,R1可以是H。

在一个实施例中,R2可以是H、卤素或甲基。

在一个实施例中,R5可以是H或CH₃。例如,R5可以是CH₃。

在一个实施例中,R5可以是乙基。

在一个实施例中,R4是叔丁基。

在一个实施例中,Z2可以是-O-或-NH-。例如,Z2可以是O。替代地,Z2可以是-NH-。

在一个实施例中,R5是甲基;Z2是-O-;以及R4是叔丁基。

在一个实施例中,R5是甲基;Z2是-NH-;以及R4是叔丁基。

在一个实施例中,R5是H;Z2是-O-;以及R4是叔丁基。例如,R1也是C1-3烷基;和/或R2是H或甲基。

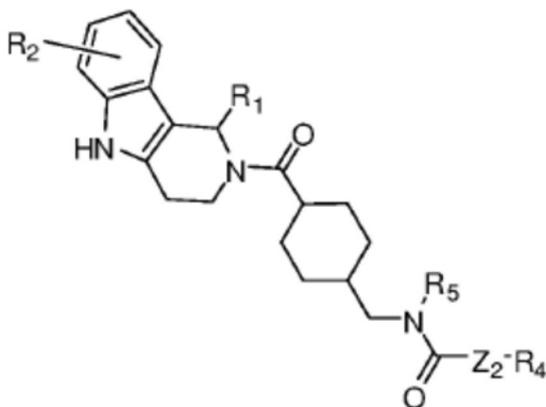
在一个实施例中,R1是C1-4烷基;R2是H、卤素或甲基;R5是甲基;Z2是-O-;R4是叔丁基。在本上下文中,G3可以是CH。

]在一个实施例中,G3是N,R1是异丁基,R5是氢,Z2是氧,R4是叔丁基,以及R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在另一个实施例中,G3是N,R1是异丁基或异丙基,R5是氢或甲基,Z2是氧,R4是叔丁基,以及R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在另一个实施例中,G3是N,R1是异丁基或异丙基,R5是氢,Z2是-CH₂-或氧,R4是叔丁基或CH₃,以及R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在一个方面,本发明公开了具有式17的化合物:



R1是H、任选取代的C1-C6烷基;任选取代的C2-C6烯基;任选取代的C1-C6烷氧基;任选取代的C6-C12芳基;具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基;任选取代的C7-C15芳基烷基(例如但不限于苄基或 α -甲基苄基);具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C2-C15杂芳基烷基;任选取代的C7-C15芳基烯基;任选取代的C3-C8环烷基;或任选取代的C4-C8环烷基烷基;

R2是氢、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基或乙氧基)、三氟甲基、卤素、甲基羧基、乙

基羧基、任选取代的C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H;

R5是H、甲基、乙基、C1-C6烷基、C1-C3芳基烷基或2-苯乙基;

Z2是键、-NH-、-O-、-S-、-CH(CH₃)-、-CH₂-、-(CH₂)_n-、-CH=CH-、-CO-、-SO-、-SO₂-、-C(=NH)-、-CH₂NH(CO)-、-CH₂NH(CO)O-、-CH₂NH(CO)NH-;-(CH₂)_nNH(CO)-、-(CH₂)_nNH(CO)O-、-(CH₂)_mNH(CO)NH-;

R4是H、任选取代的C1-C9烷基(例如但不限于叔丁基);任选取代的C2-C6烯基;任选取代的C6-C12芳基(例如但不限于任选取代的苯基);具有1至4个独立地选自N、S和O的环原子的任选取代的C1-C9杂芳基;任选取代的C7-C15芳基烷基(例如但不限于苄基或 α -甲基苄基);-O-叔丁基;

m=1-5;n=1-8;

其中,“取代的”是指被独立地选自以下的一个或多个取代:卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、甲氧基、乙氧基、C1-C6烷氧基、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在一个实施例中,R1可以是异丙基或异丁基。

在一个实施例中,R1可以是H。

在一个实施例中,R2可以是H、卤素或甲基。例如,R2可以是H。

在一个实施例中,R5可以是H或CH₃。例如,R5可以是CH₃。

在一个实施例中,R4是叔丁基。

在一个实施例中,Z2可以是-O-或-NH-。例如,Z2可以是O。替代地,Z2可以是-NH-。

在一个实施例中,R5是甲基;Z2是-O-;以及R4是叔丁基。

在一个实施例中,R5是甲基;Z2是-NH-;以及R4是叔丁基。

在一个实施例中,R1是异丁基,R5是氢,Z2是氧,R4是叔丁基,以及R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在另一个实施例中,R1是异丙基,R5是氢,Z2是氧,R4是叔丁基,以及R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在另一个实施例中,R1是异丁基或异丙基,R5是氢或甲基,Z2是氧,R4是叔丁基,以及R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在另一个实施例中,R1是异丁基或异丙基,R5是氢,Z2是-CH₂-或氧,R4是叔丁基或CH₃,以及R2是氢、卤素、三氟甲基、甲基羧基、乙基羧基、C1-C6烷氧基(例如但不限于甲氧基和乙氧基)、C1-C6烷基、-OH、-SH、-NH₂、-N₃、-CN、-NO₂、-CHO、-COOH、-CONH₂、-C(=NH)NH₂或-SO₃H。

在另一个实施例中,R1是H;R2是H;R5是CH₃;Z2是-O-或-NH-;以及R4是C4烷基(例如叔丁基)。

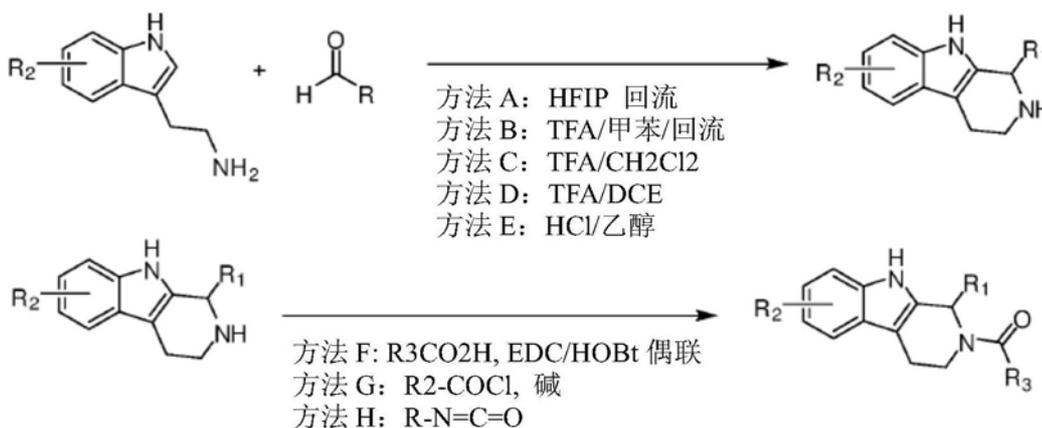
化学同类物的合成途径

使用先前在文献中描述的熟知的有机化学技术合成本申请中描述的化合物(参见反应方案)。

环化方法A-E:在各种溶剂和温度下,使用1,1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇(Lewis酸)或三氟乙酸(Bronsted酸),将未取代的色胺和取代的色胺与脂肪族和芳香族醛在Pictet-Spangler型杂环化反应中反应,以提供在R1和R2处取代的四氢-β-咔啉。偶联方法F-H:然后将四氢-β-咔啉的碱性仲氮与羧酸(在偶联剂存在下)、酰氯在碱存在下酰化或与异氰酸酯酰化,生成脲。

关于用于本文所述的每个同类物所用的具体合成方法,参见物理数据和合成方法表。

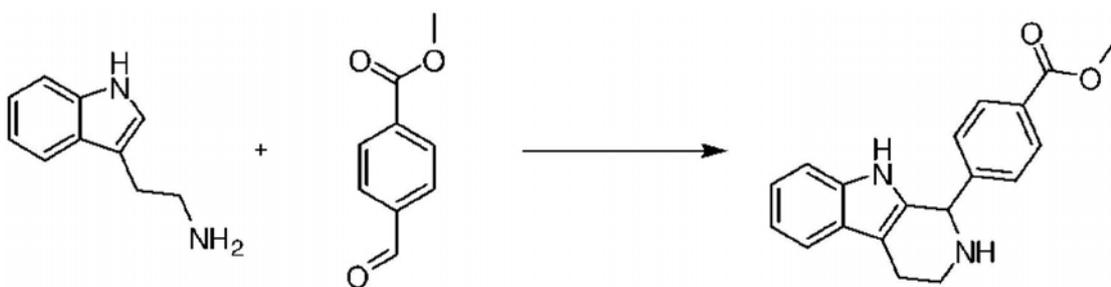
反应方案



实验方法

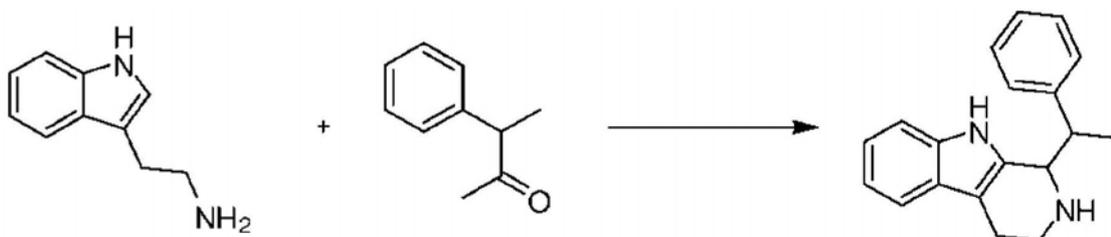
所有溶剂和试剂均购自Sigma-Aldrich、Fisher Scientific或其他商业供应商,使用时未经进一步纯化。用于NMR实验的所有氘代溶剂均购自Sigma-Aldrich,使用时未经进一步纯化。所有¹H NMR实验均使用Varian 400MHz Unity Inova NMR光谱仪进行。¹H NMR光谱是通过16次扫描获得的,使用延迟时间(d1)=1秒。光谱宽度为=20ppm(从-3ppm到20ppm)。NMR实验由Custom NMR Services(美艾尔(Ayer),马萨诸塞州(MA))进行。使用LC/MS进行质谱实验。通常在二氯甲烷中以1mg/mL的浓度制备样品,每次采集注射1uL。质谱实验由布朗大学(普罗维登斯(Providence),罗得岛州(RI))的Tun-Li Shen博士进行。通过使用Hydracid Papers 1-6(Micro Essential Laboratory-Brooklyn,纽约州)或使用Fisher Scientific pH计(型号AB15)来确定pH测量值。使用附接到KD Scientific 100型注射泵的Hamilton 10mL气密注射器进行试剂的受控添加。所有惰性气氛均使用压缩氩气(超高纯度-Igo's Welding Supply-沃特敦(Watertown),马萨诸塞州(MA))作为气球,使用附接到针头上的Perfectum针头连接器或在Sigma-Aldrich Atmos手套袋中实现。实验室玻璃器皿由Sigma-Aldrich、Ace glass、Chemglass或VWR Scientific生产。使用Sigma-Aldrich硅胶(230-400目,等级60,目录#717185)进行硅胶纯化。使用EMD TLC硅胶60F254板(2.5x7.5cm,cat.#1153410001)进行TLC。通过I2-硅胶或UV光使TLC可视化。使用Luna 5u C18(2)100A柱(50x 2.00mm,Phenomenex)在Agilent HP 1090HPLC上进行高效液相色谱(HPLC)分析,并使用标准溶剂梯度程序在254nm和220nm处进行UV检测;溶剂A为0.4%TFA的水溶液;溶剂B为0.4%TFA的乙腈溶液;HPLC梯度:5%B(0-0.5min),100%B(斜坡0.5-5min),100%B(5-7min),5%B(7-7.01min),5%B(7.01-9min)。

合成例1(通过方法D环化)



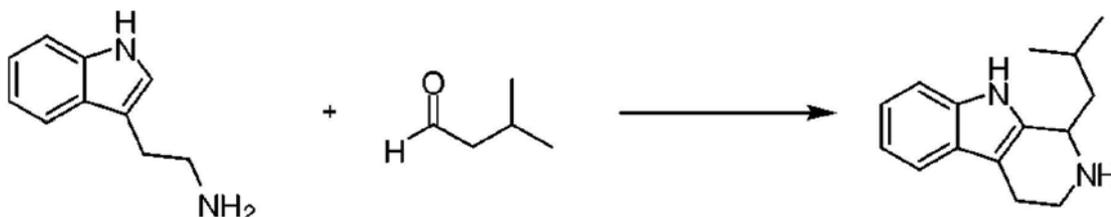
将色胺 (1.00g, 6.26mmol)、4-甲酰基苯甲酸甲酯 (1.03g, 6.24mmol) 和4A分子筛 (0.76g) 悬浮在1,2-二氯乙烯 (DCE) (30mL) 中。将三氟乙酸 (TFA) (285mg, 2.50mmol) 加入到混合物中, 并使反应回流, 得到亮棕色沉淀。将混合物冷却至30℃, 并通过玻璃棉塞除去4A分子筛。用饱和NaHCO₃ (15mL) 淬灭溶液, 并用EtOAc (50mL) 稀释。用饱和NaCl洗涤有机层并干燥 (无水MgSO₄)。真空除去溶剂, 得到浅棕色固体。通过快速柱色谱法进一步纯化该物质: 用MeOH、EtOAc和己烷 (1:3:6) 洗脱。合并含有产物的级分, 得到浅棕色固体 (0.80g, 42%产率; TLC_{Rf}=0.129 (10%MeOH/30%EtOAc/己烷); HPLC R_t=3.254min)。该中间体用于合成以下化合物: Mn0642和MN1210。

合成例3: MN1179 (通过方法B环化)



将色胺 (5.00g, 31.2mmol) 加入到甲苯 (100mL) 中。将2-苯基丙醛 (4.2mL, 31.2mmol) 和TFA (0.60mL, 7.8mmol) 加入到混合物中。搅拌反应并回流过夜, 使用Dean-Stark分水器以除去水。将反应冷却至室温, 加入EtOAc (100mL), 并用饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 洗涤有机层, 然后用NaCl (25mL) 洗涤。真空除去溶剂, 得到棕色固体。将固体溶解在EtOAc (50mL) 中, 加入庚烷 (50mL), 并将反应物置于冰上。过滤溶液, 并干燥剩余物质。将固体溶于CH₂Cl₂中, 并用真空快速色谱法进一步纯化: 5个级分, 由0%、1%、3%、5%和5%MeOH的CH₂Cl₂溶液组成。合并含有产物的级分, 真空除去溶剂, 得到固体 (5.10g, 59.1%产率; TLC R_f=0.34 (3%MeOH/CH₂Cl₂); HPLC R_t=3.187min)。该中间体用于合成以下化合物: MN1130、MN1135、MN1151、MN1152和MN1171。

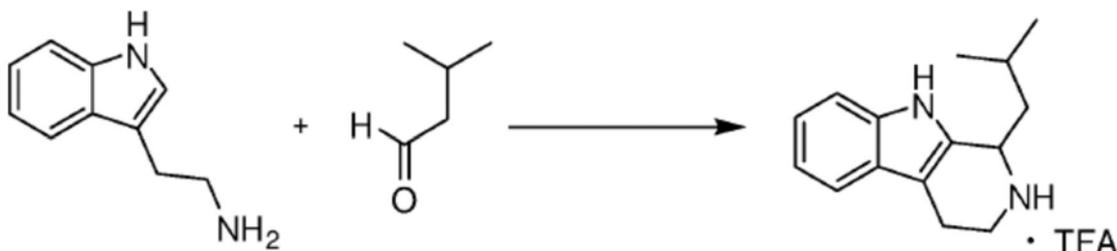
合成例4: MN1180 (通过方法A环化)



将色胺 (1.6g, 10mmol) 溶于1,1,1,3,3,3-六氟-2-异丙醇 (16mL) 中, 并通过注射器加入到异戊醛 (1.3mL; 12mmol) 中。将反应物加热至回流18.5小时, 并在氮气惰性气氛下搅拌。蒸发溶剂, 并在真空下与CHCl₃ (3x 50mL) 共沸。加入己烷 (16mL), 并将混合物在浴中超声

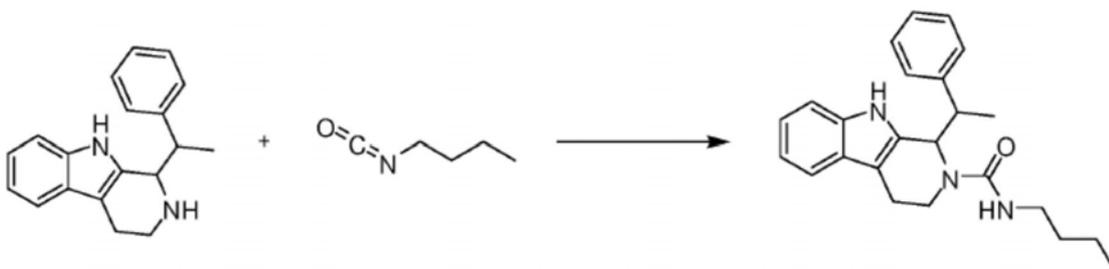
10min,然后搅拌过夜。过滤混合物,得到固体(1.9g)。通过与5N NH_4OH (10mL)搅拌研磨20分钟,进一步纯化物质。过滤所得物,然后用 H_2O (2x 20mL)洗涤。过滤所得固体,并在真空干燥器中干燥,得到固体(1.60g,71.0%产率;TLC $R_f=0.30$ (10%MeOH/1% $\text{NH}_4\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$);HPLC $R_t=3.081\text{min}$ 。该中间体用于合成以下化合物:

合成例5:MN1180(通过方法C环化)



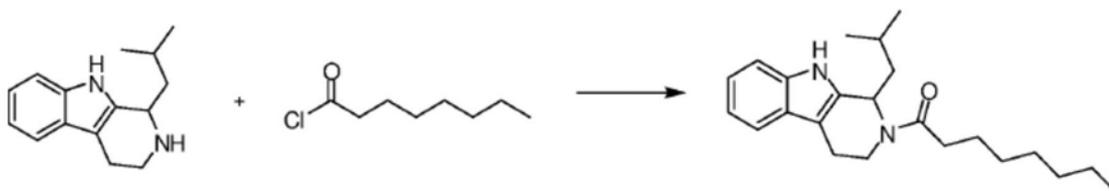
将色胺(8.0g,50mmol)溶于 CH_2Cl_2 (400mL),并在氩气惰性气氛下放置20min。将异戊醛(5.36mL,50.0mmol)加入到溶液中,并将反应置于 -80°C 的冰浴中20min。在15分钟内逐滴加入TFA(38.3mL)。从水浴中移出反应物,允许其温热至室温,并搅拌20hr。蒸发溶剂,得到黑色油状物。将油状物溶解在 CH_2Cl_2 (250mL)中,且加入1N NaOH 并摇动。收集沉淀物并在真空干燥器中干燥以提供17.9g的橄榄色粉末(TFA盐)。将TFA盐从回流的乙腈中重结晶。用冷ACN($\sim 20\text{mL}$)洗涤收集的固体并干燥,得到结晶固体(9.3g,54%产率;TLC $R_f=0.30$)(10%MeOH/1% $\text{NH}_4\text{OH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$);HPLC $R_t=3.099\text{min}$)。该中间体用于合成以下化合物:MN1132、MN1133、MN1137、MN1138、MN1157、MN1186、MN1189、MN1190、MN1194、MN1195、MN1197、MN1203、MN1206、MN1207、MN1208、MN1209、MN1212、MN1213、MN1214、MN1220、MN1221、MN1222、MN1223、MN1224、MN1225、MN1226、MN1231、MN1232、MN1246。

合成例7:MN1130(通过方法H偶联)



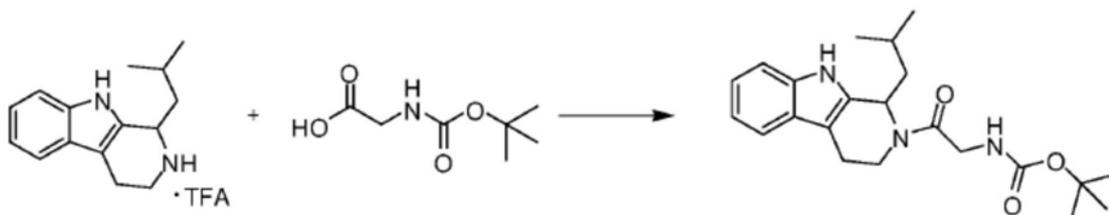
将1-(1-苯乙基)-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚(276mg,1.00mmol)溶解于 CHCl_3 (50mL)中并在氮气惰性气氛下冰浴10min。通过注射器添加异氰酸丁酯(170 μL ,1.50mmol)。从冰浴中移出反应物,并允许其温热至室温10min。HPLC表明反应在1hr完成。蒸发反应物并在真空下干燥。将剩余物溶于EtOAc(100mL)中,用1M柠檬酸(3x 25mL)、饱和 NaHCO_3 (3x 25mL)和饱和 NaCl (25mL)洗涤。干燥(无水 Na_2SO_4)有机层,过滤,并在真空下蒸发,得到灰白色固体(339mg)。通过与40%EtOAc/60%己烷(3mL)搅拌研磨1hr,进一步纯化物质,然后通过研磨收集产物。通过与40%EtOAc/60%己烷(3mL)搅拌1hr来重复研磨。过滤所得固体,并在真空干燥器中干燥,得到白色固体(138mg,36.7%产率;TLC $R_f=0.46$ (40%EtOAc的己烷溶液);HPLC $R_t=4.598\text{min}$);MS m/z 375.2412(100%相对整数)。该方法用于合成以下化合物:MN733、MN1130、MN1131、MN1158、MN1160、MN1169、MN1171、MN1172、MN1184。

合成例8:MN1132(通过方法G偶联)



将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 (228mg, 1.00mmol) 溶解于CH₂Cl₂ (10mL) 中并在氮气惰性气氛下冰浴6min。通过注射器加入辛酰氯 (170μL, 1.00mmol), 然后直接加入三乙胺 (TEA) (140μL, 1.00mmol)。从冰浴中移出反应物, 并允许其温热至室温 10min。HPLC表明反应在10min完成。用EtOAc (100mL) 稀释溶液, 用1N HCl (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (25mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将所得油状物溶解在CH₂Cl₂ (5mL) 中, 并在真空下除去溶剂。用己烷 (3mL) 洗涤油状剩余物, 除去顶部任何可溶于己烷的杂质。该物质通过硅胶色谱法进一步纯化: 5个级分 (每个 200mL), 由0%、5%、10%、15%和20%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 真空除去溶剂, 得到油状物。将该油状物溶于CH₂Cl₂ (~1mL) 中, 并在冰浴中缓慢蒸发, 得到白色固体。高真空下干燥固体, 得到黄色油状物 (236mg, 67.0%产率; TLC R_f=0.28 (10%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=5.299min); ¹H NMR (CDCl₃, 0.003%v/v TMS, 400MHz): δ 0.85-1.10 (9H, m), 1.20-1.40 (8H, m), 1.55-1.80 (5H, m), 2.30-2.55 (2H, dq), 2.65-2.90 (2H, m), 3.45-3.55 (1H, m), 4.00-4.10 (1H, dd), 5.87 (1H, t), 7.10 (1H, t), 7.15 (1H, t), 7.30 (1H, d), 7.47 (1H, d), 7.80 (1H, br s)。该方法用于合成以下化合物: MN0477、MN0642、MN0908、MN1132、MN1133、MN1135、MN1137、MN1138、MN1152、MN1156、MN1157、MN1188、MN1193、MN1197、MN1203、MN1206、MN1207、MN1208、MN1209、MN1210、MN1211、MN1212、MN1213、MN1214、MN1216、MN1217、MN1218、MN1219。

合成例11: MN1186 (通过方法F偶联)

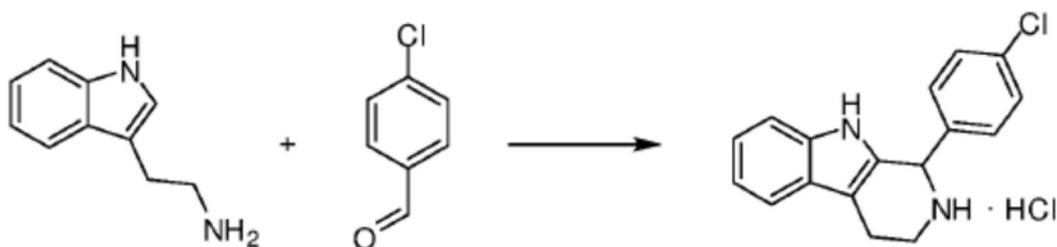


将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 · TFA盐 (410mg, 1.20mmol)、1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (230mg, 1.20mmol)、4-二甲基氨基吡啶 (DMAP) (13mg, 0.12mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (61mg, 0.40mmol) 和Boc-甘氨酸 (210mg, 1.20mmol) 全部溶解在乙腈 (ACN) (1.5mL)、二甲基甲酰胺 (DMF) (6mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (240μL, 1.44mmol) 中。将溶液搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释溶液, 用1N HCl (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (25mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发, 得到油状物。该物质通过硅胶色谱法进一步纯化, 使用: 9个级分 (200mL), 由0%、1%、2%、4%、4%、5%、5%、5%和5%EtOAc的CH₂Cl₂溶液组成。合并含有产物的级分, 真空下干燥溶剂, 得到白色固体 (331mg, 71.6%产率; TLC R_f=0.59 (10%EtOAc的CH₂Cl₂溶液); HPLC R_t=4.577min); ¹H NMR (CDCl₃, 0.003%v/v TMS, 400MHz): δ_H 0.95 (3H, d) 1.10 (3H, d), 1.45 (9H, s), 1.55-1.85 (3H, m), 2.70-2.93 (2H, m), 3.40-3.55 (1H, m), 3.87-4.20 (3H, m), 5.60 (1H, brs), 5.80 (1H, dt), 7.05-7.20 (2H, m), 7.30 (1H, d), 7.45 (1H, d), 7.80

(1H, br s)。

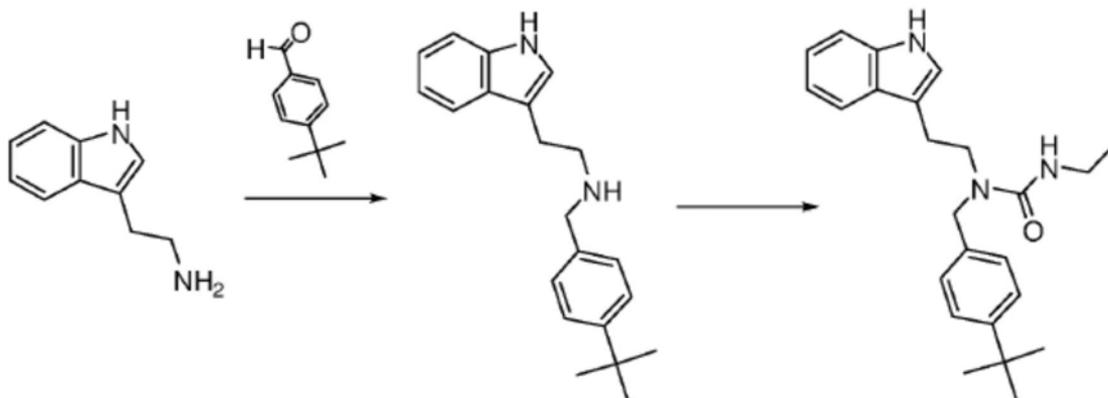
以类似于MN1186的方式合成以下化合物:MN1462、MN1463、MN1464、MN1465、MN1466、MN1467、MN1468、MN1469、MN1470和MN1471。

合成例25:MN1254 (通过方法E环化)



通过旋转并用热风枪加热将色胺 (1.60g, 10mmol) 溶解在EtOAc (5mL) 中直至溶解。然后加入4-氯苯甲醛 (1.48g, 10.5mmol)。旋转反应容器并用热风枪加热溶解。席夫碱中间体在2分钟内沉淀。将反应混合物冷却至室温,并在烧结玻璃上收集中间体席夫碱,然后在真空下干燥,得到2.36g作为棕褐色粉末的中间体。将席夫碱溶解在乙腈/无水乙醇 (12.5mL/12.5mL) 中。加入4N HCl的二恶烷溶液 (4mL, 16mmol)。将溶液加热至回流,这时环化产物的HCl盐开始沉淀。然后将反应混合物冷却至-20℃,并在烧结玻璃上收集固体。将产物1-(4-氯苯基)-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚盐酸盐在真空下干燥,得到2.16g灰白色粉末,产率为85% (全部68%):Mp:163-165C (游离碱)。

合成例27:MN0716 (吲哚同类物合成)

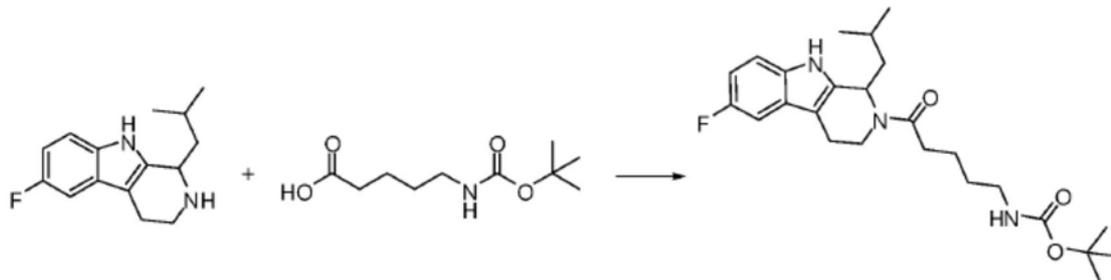


N-(4-叔丁基苄基)-2-(1H-吲哚-3-基)乙胺:在色胺 (1.5g, 9.4mmol) 的无水EtOH (15mL) 溶液中加入4-叔丁基苯甲醛 (2.0mL, 12mmol)。搅拌反应物1h,然后冷却至0℃,然后加入NaBH₄ (750mg, 19mmol)。将溶液在0℃下搅拌1h。真空浓缩溶液,然后在高真空下干燥。然后用1N HCl (~20mL) 淬灭反应,然后加入EtOAc (100mL) 以形成沉淀。用固体K₂CO₃使混合物为碱性 (pH 10)。分离层,经Na₂O₄干燥并蒸发,得到300mg油状物。通过首先添加1N HCl (10mL) 来纯化该物质,然后添加EtOAc (50mL) 以使N-(4-叔丁基苄基)-2-(1H-吲哚-3-基)乙胺沉淀为固体:260mg (9%产率);HPLC Rt (2.757min)。

在N-(4-叔丁基苄基)-2-(1H-吲哚-3-基)乙胺 (100mg, 0.327mmol) 的CH₂Cl₂冰冷溶液中加入异氰酸乙酯 (26μL, 0.327mmol) (在1.5mL CH₂Cl₂中冷却至0℃)。将反应物在0℃搅拌5min。1h后,然后加入0.2当量的异氰酸乙酯,并再搅拌30min。用CH₂Cl₂稀释溶液并用饱和NaHCO₃洗涤。将溶液在硅胶上用色谱法分析,用己烷/乙酸乙酯 [2:1至1:1] 洗脱,得到

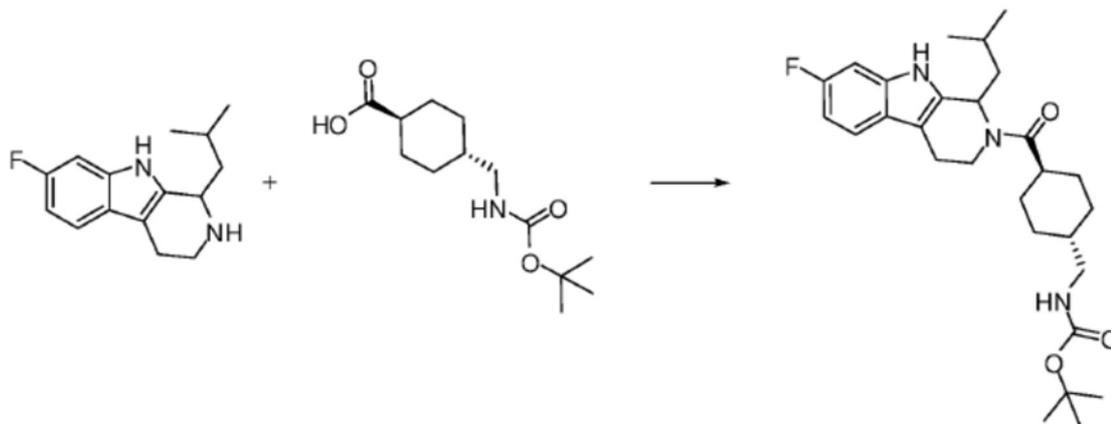
129mg, 100%产物产率; HPLC Rt 4.664min; TLC Rf 0.16, 10%EtOAc的CH₂Cl₂溶液。该方法用于合成以下化合物: MN0716、MN0733和MN1058、

合成例28: MN1292



将6-氟-1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚(246mg, 1.00mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (192mg, 1.00mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (12mg, 0.10mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (51mg, 0.33mmol) 和5-(叔丁氧基羰基氨基)戊酸(217mg, 1.00mmol)全部溶解在乙腈 (ACN) (1.25mL)、二甲基甲酰胺 (DMF) (5mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (200 μ L, 1.20mmol) 中。将反应物在RT下搅拌18小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥(无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶色谱法进一步纯化, 使用: 3个级分 (200mL), 由己烷27.5%EtOAc的己烷溶液和35%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (269mg, 60.4%产率; TLC R_f=0.14 (30%EtOAc的己烷溶液); HPLC Rt=4.683min)。

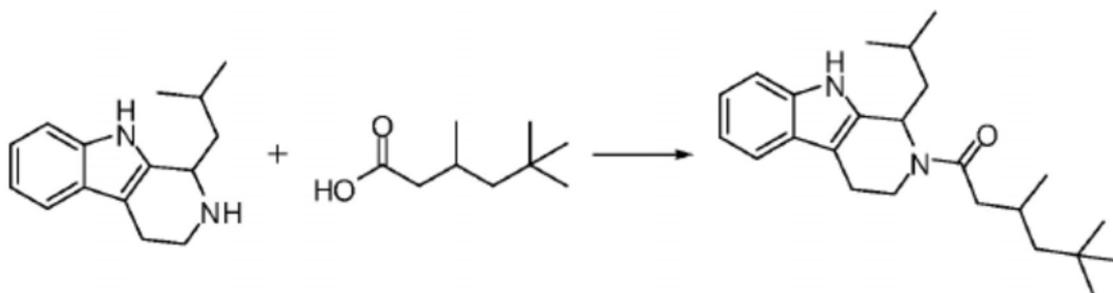
合成例29: MN1293



将7-氟-1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚(246mg, 1.00mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (192mg, 1.00mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (12mg, 0.10mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (51mg, 0.33mmol) 和反-4-((叔丁氧基羰基氨基)甲基)环己烷羧酸(257mg, 1.00mmol)全部溶解在乙腈 (ACN) (1.25mL)、二甲基甲酰胺 (DMF) (5mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (200 μ L, 1.20mmol) 中。将反应物在RT下搅拌18小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥(无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 3个级分 (200mL), 由己烷、25%EtOAc的己烷溶液和30%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (280mg,

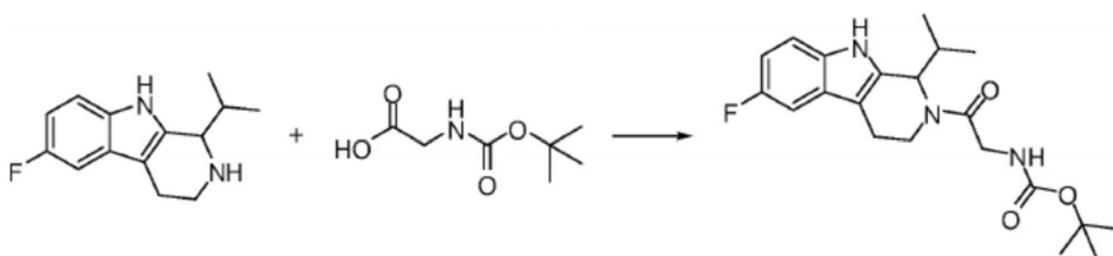
57.7%产率;TLC $R_f=0.21$ (30%EtOAc的己烷溶液);HPLC $R_t=4.885\text{min}$ 。

合成例30:MN1294



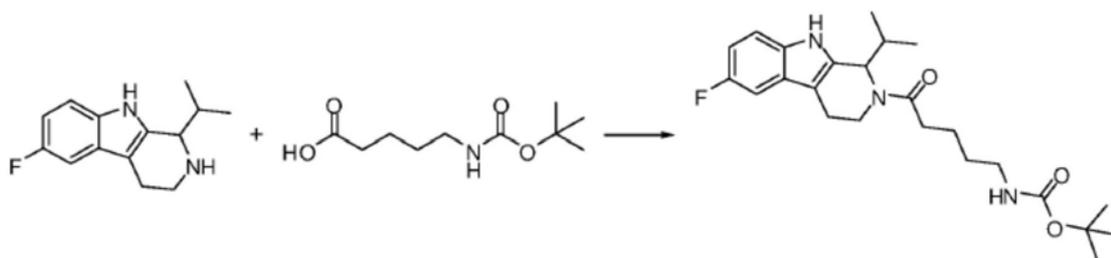
将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 (228mg, 1.00mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (192mg, 1.00mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (12mg, 0.10mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (51mg, 0.33mmol) 和3,5,5-三甲基己酸 (158mg, 1.00mmol) 全部溶解在乙腈 (ACN) (1.25mL)、二甲基甲酰胺 (DMF) (5mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (200 μL , 1.20mmol) 中。将反应物在RT下搅拌18小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物,用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化,使用:3个级分 (200mL),由己烷、10%EtOAc的己烷溶液和17%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体 (315mg, 85.5%产率;TLC $R_f=0.12$ (10%EtOAc的己烷溶液);HPLC $R_t=5.271\text{min}$)。

合成例31:MN1305



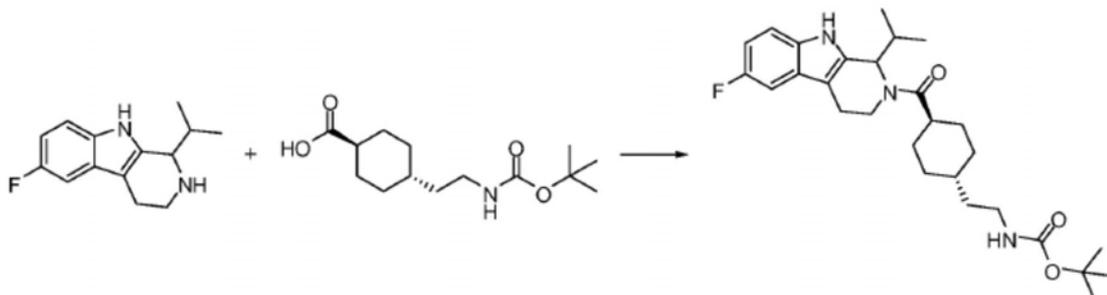
将6-氟-1-异丙基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 (232mg, 1.00mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (192mg, 1.00mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (12mg, 0.10mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (51mg, 0.33mmol) 和Boc-甘氨酸 (175mg, 1.00mmol) 全部溶解在乙腈 (ACN) (1.25mL)、二甲基甲酰胺 (DMF) (5mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (200 μL , 1.20mmol) 中。将反应物在RT下搅拌48小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物,用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化,使用:2个级分 (200mL),由己烷和50%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体 (360mg, 92.4%产率;TLC $R_f=0.59$ (50%EtOAc的己烷);HPLC $R_t=4.386\text{min}$)。

MN1306-6-氟-异丙基吡啶与戊酸衍生物



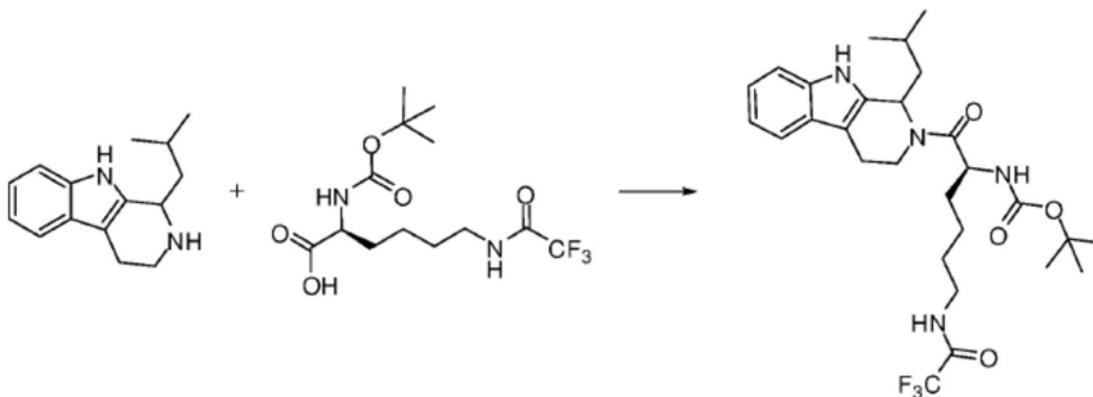
将6-氟-1-异丙基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 (232mg, 1.00mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (192mg, 1.00mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (12mg, 0.10mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (51mg, 0.33mmol) 和 boc-戊酸 (217mg, 1.00mmol) 全部溶解在乙腈 (ACN) (1.25mL)、二甲基甲酰胺 (DMF) (5mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (200 μ L, 1.20mmol) 中。将反应物在RT下搅拌48小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 2个级分 (200mL), 由己烷和50%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (355mg, 82.3%产率; TLC R_f=0.24 (50%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=4.504min)。

合成例32: MN1307



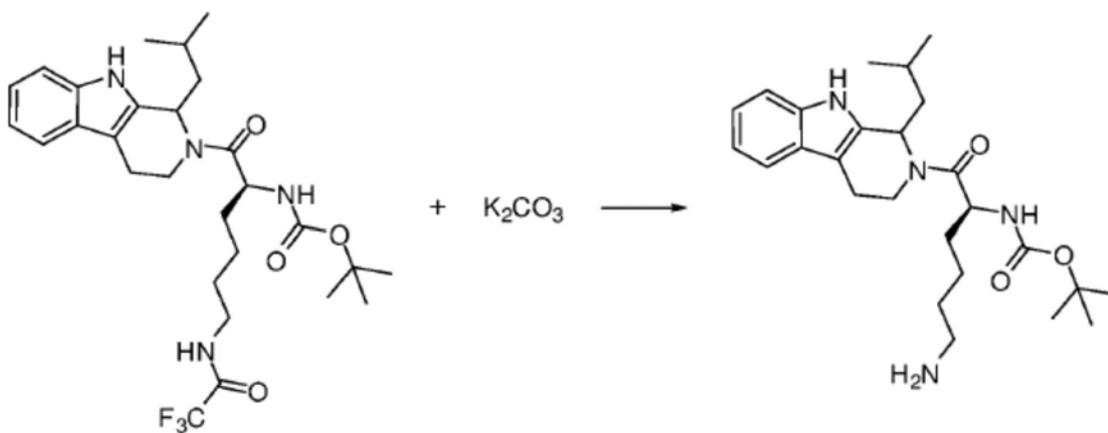
将6-氟-1-异丙基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 (232mg, 1.00mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (192mg, 1.00mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (12mg, 0.10mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (51mg, 0.33mmol) 和 boc-氨甲环酸 (257mg, 1.00mmol) 全部溶解在乙腈 (ACN) (1.25mL)、二甲基甲酰胺 (DMF) (5mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (200 μ L, 1.20mmol) 中。将反应物在RT下搅拌48小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 2个级分 (200mL), 由己烷和50%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (391mg, 82.9%产率; TLC R_f=0.36 (50%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=4.712min)。

合成例33: MN1308



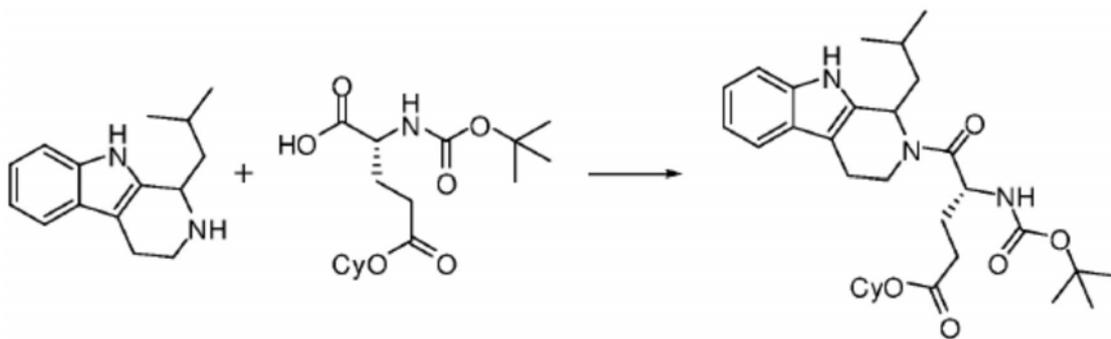
将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 (456mg, 2.00mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (383mg, 2.00mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (24mg, 0.20mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (102mg, 0.66mmol) 和 (S)-2-(叔丁氧羰基氨基)-6-(2,2,2-三氟乙酰胺基)己酸 (684mg, 2.00mmol) 全部溶解在乙腈 (ACN) (2.5mL)、二甲基甲酰胺 (DMF) (10mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (400 μ L, 2.40mmol) 中。将反应物在RT下搅拌18小时。用 EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 己烷 (200mL) 冲洗, 3个级分 (200mL), 由 20%、25% 和 30% EtOAc 的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (820mg, 74% 产率; TLC R_f=0.10 (25% EtOAc 的己烷溶液); HPLC R_t=4.743min)。

合成例34: MN1309



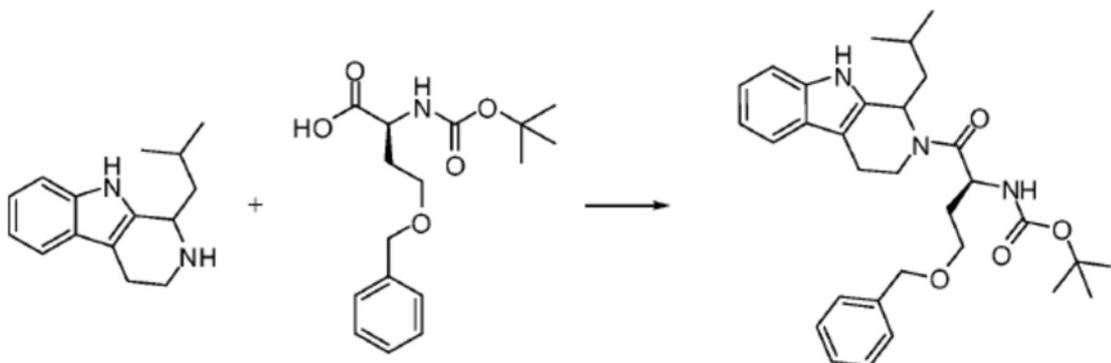
(2S)-1-(1-异丁基-3,4-二氢-1H-吡啶基[3,4-b]吲哚-2(9H)-基)-1-氧代-6-(2,2,2-三氟乙酰胺基)己-2-基氨基甲酸叔丁酯 (553mg, 1.00mmol) 溶于 MeOH (100mL) 中。将 K₂CO₃ (690mg, 5.00mmol) 加入到溶液中。将溶液回流 18hr。真空除去溶剂并将所得油状物溶于 EtOAc (100mL) 中。用 1M NaOH (25mL) 和饱和 NaCl (25mL) 洗涤溶液。干燥 (无水 Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发, 得到固体 (371mg, 81.2% 产率; TLC R_f=0.05 (5% MeOH 的 CH₂Cl₂ 溶液+1% NH₄OH); HPLC R_t=3.909 和 3.955min (非对映体))。

合成例35: MN1310



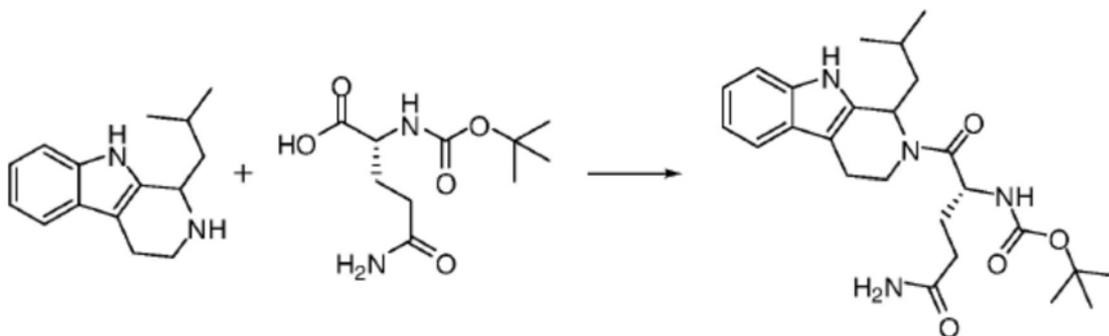
将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 (456mg, 2.00mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (383mg, 2.00mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (24mg, 0.20mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (102mg, 0.66mmol) 和 (R)-2-(叔丁氧羰基氨基)-5-(环己氧基)-5-氧戊酸 (659mg, 2.00mmol) 全部溶解在乙腈 (ACN) (2.5mL)、二甲基甲酰胺 (DMF) (10mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (400 μ L, 2.40mmol) 中。将反应物在RT下搅拌18小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 4个级分 (200mL), 由己烷、15%EtOAc的己烷溶液、17.5%EtOAc的己烷溶液和22.5%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (808mg, 74.9%产率; TLC R_f=0.20 (20%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=5.269min)。

合成例36: MN1311



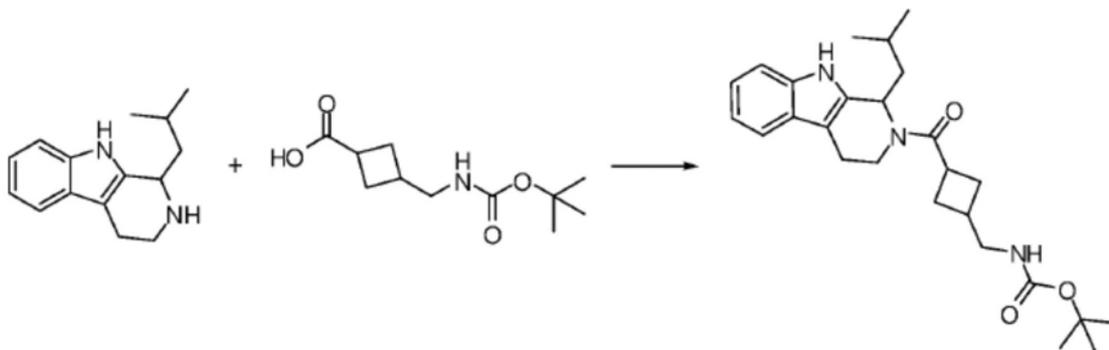
将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 (457mg, 2.00mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (383mg, 2.00mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (24mg, 0.20mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (102mg, 0.66mmol) 和 (S)-4-(苄氧基)-2-(叔丁氧基羰基氨基)丁酸 (619mg, 2.00mmol) 全部溶解在乙腈 (ACN) (2.5mL)、二甲基甲酰胺 (DMF) (10mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (400 μ L, 2.40mmol) 中。将反应物在RT下搅拌18小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 4个级分 (200mL), 由己烷、15%EtOAc的己烷溶液、20%EtOAc的己烷溶液和25%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (688mg, 66.2%产率; TLC R_f=0.34 (30%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=5.107min)。

合成例37: MN1312



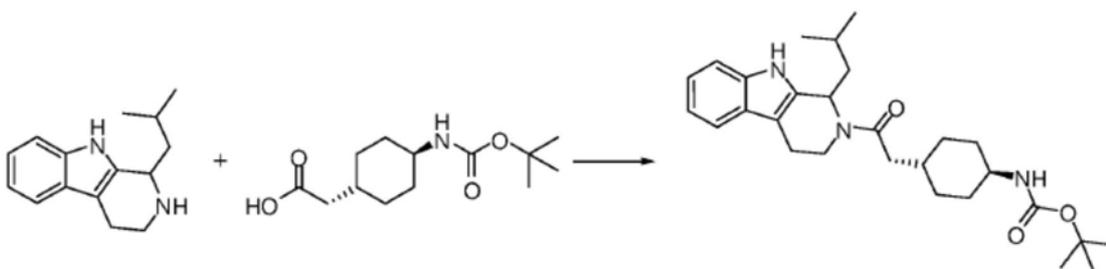
将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 (228mg, 1.00mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (192mg, 1.00mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (12mg, 0.10mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (51mg, 0.33mmol) 和 (R)-5-氨基-2-(叔丁氧羰基氨基)-5-氧戊酸 (246mg, 1.00mmol) 全部溶解在乙腈 (ACN) (1.25mL)、二甲基甲酰胺 (DMF) (5mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (200 μ L, 1.20mmol) 中。将反应物在RT下搅拌18小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物,用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化,使用:4个级分 (200mL),由CH₂Cl₂,4%、4.5%和5%MeOH的CH₂Cl₂溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体 (264mg, 57.8%产率;TLC R_f=0.05 (4%MeOH的CH₂Cl₂溶液);HPLC R_t=4.149min)。

合成例38:MN1317



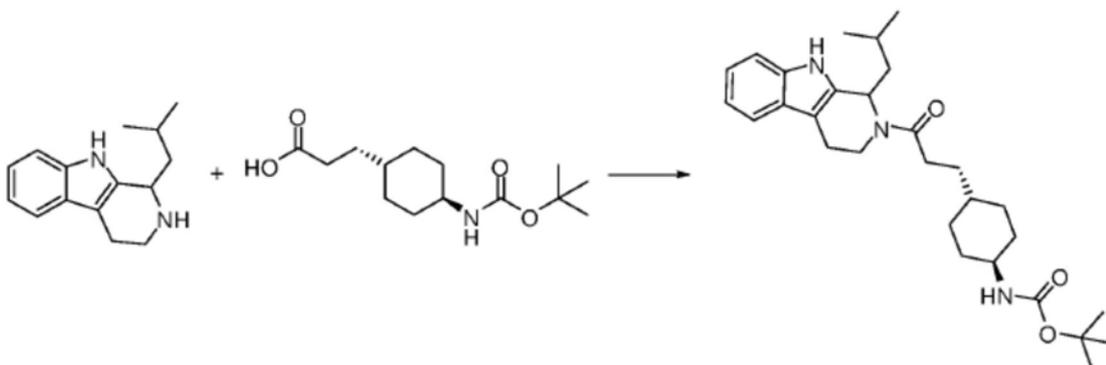
将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 (158.5mg, 0.694mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (133mg, 0.694mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (8.5mg, 0.0694mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (35mg, 0.229mmol) 和3-((叔丁氧基羰基氨基)甲基)环丁烷羧酸 (159mg, 0.694mmol) 全部溶解在乙腈 (867.5 μ L)、二甲基甲酰胺 (DMF) (3.47mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (134 μ L, 0.833mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物,用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化,使用:4个级分 (200mL),由己烷、20%EtOAc的己烷溶液、25%EtOAc的己烷溶液c和32%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体 (149mg, 48.8%产率;TLC R_f=0.12 (25%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=4.713min)。

合成例39:MN1318



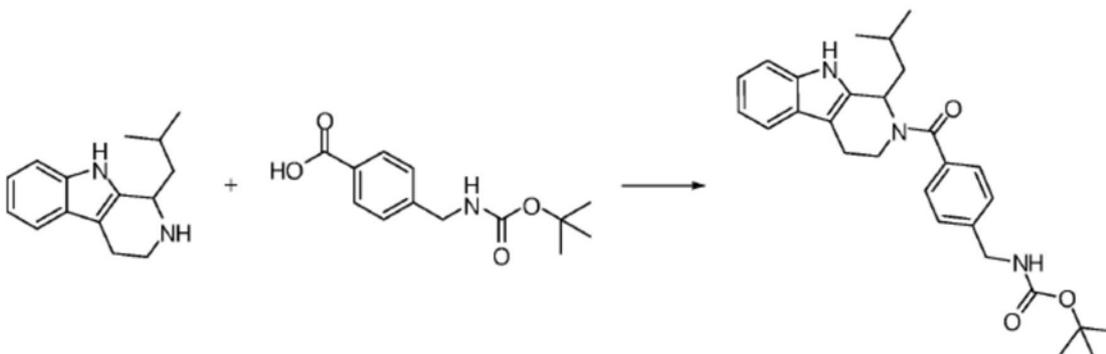
将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 (158.5mg, 0.694mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (133mg, 0.694mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (8.5mg, 0.0694mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (35mg, 0.229mmol) 和2-(反-4-(叔丁氧基羰基)环己基)乙酸 (178mg, 0.694mmol) 全部溶解在乙腈 (867.5 μ L)、二甲基甲酰胺 (DMF) (3.47mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (134 μ L, 0.833mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥(无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 4个级分 (200mL), 由己烷、20%EtOAc的己烷溶液、25%EtOAc的己烷溶液和32%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (163mg, 50.2%产率; TLC R_f=0.17 (25%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=4.870min)。

合成例40: MN1319



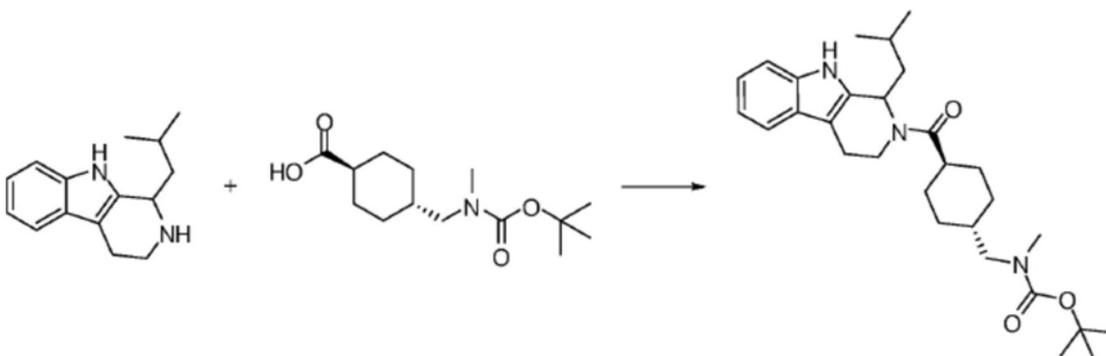
将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 (158.5mg, 0.694mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (133mg, 0.694mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (8.5mg, 0.0694mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (35mg, 0.229mmol) 和3-(反-4-(叔丁氧基羰基)环己基)丙酸 (188mg, 0.694mmol) 全部溶解在乙腈 (867.5 μ L)、二甲基甲酰胺 (DMF) (3.47mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (134 μ L, 0.833mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥(无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 4个级分 (200mL), 由己烷、20%EtOAc的己烷溶液、25%EtOAc的己烷溶液和32%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (176mg, 52.7%产率; TLC R_f=0.13 (25%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=4.984min)。

合成例41: MN1320



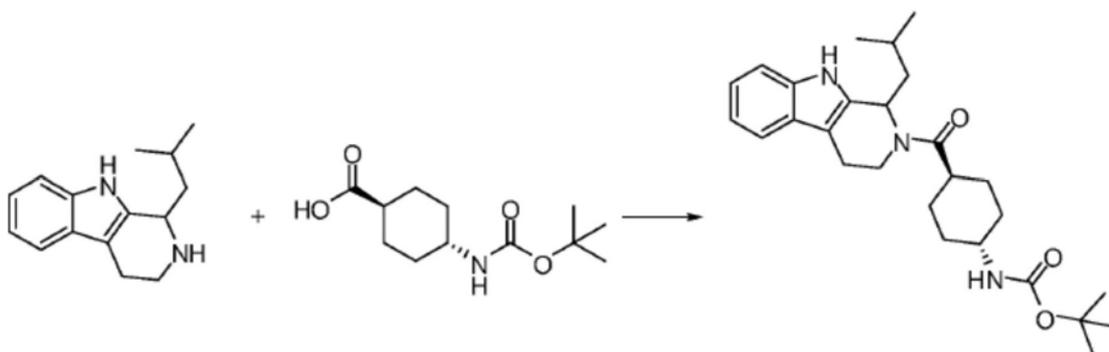
将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶 (158.5mg, 0.694mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (133mg, 0.694mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (8.5mg, 0.0694mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (35mg, 0.229mmol) 和4-(反-4-(叔丁氧基羰基氨基)甲基)苯甲酸 (174mg, 0.694mmol) 全部溶解在乙腈 (867.5 μ L)、二甲基甲酰胺 (DMF) (3.47mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (134 μ L, 0.833mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 4个级分 (200mL), 由己烷、20%EtOAc的己烷溶液、25%EtOAc的己烷溶液和32%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (162mg, 50.6%产率; TLC R_f=0.10 (25%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=4.771min)。

合成例42: MN1321



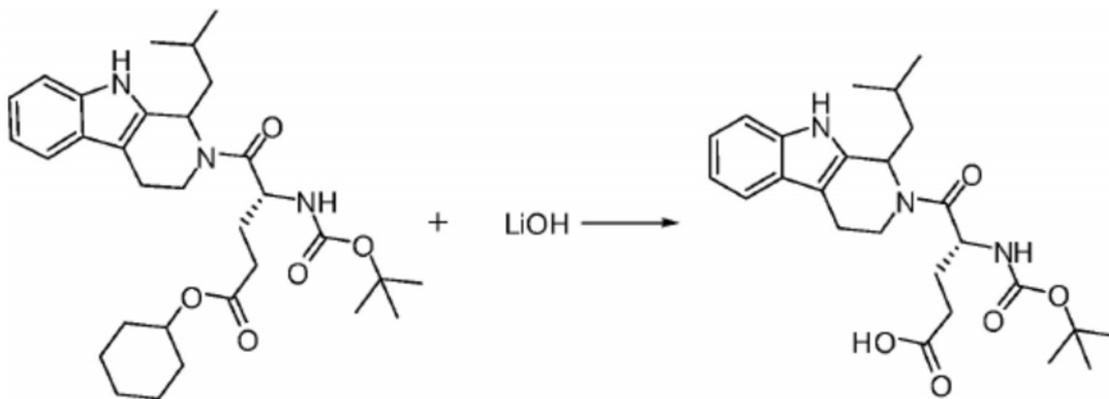
将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶 (158.5mg, 0.694mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (133mg, 0.694mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (8.5mg, 0.0694mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (35mg, 0.229mmol) 和-反-4-((叔丁氧基羰基(甲基)氨基)甲基)环己烷羧酸 (188mg, 0.694mmol) 全部溶解在乙腈 (867.5 μ L)、二甲基甲酰胺 (DMF) (3.47mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (134 μ L, 0.833mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 4个级分 (200mL), 由己烷、20%EtOAc的己烷溶液、25%EtOAc的己烷溶液和30%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (165mg, 49.4%产率; TLC R_f=0.15 (25%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=5.096min)。

合成例43:MN1322



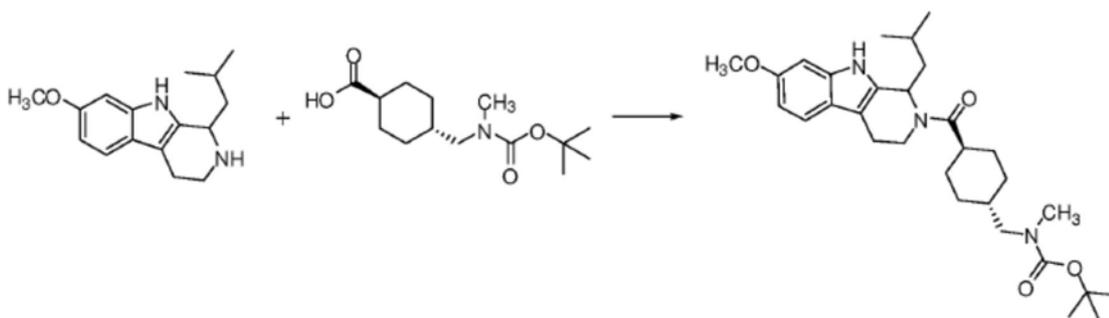
将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶 (228mg, 1.00mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (192mg, 1.00mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (12mg, 0.10mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (51mg, 0.33mmol) 和**boc**-氨甲环酸 (250mg, 1.00mmol) 全部溶解在乙腈 (1.25mL)、二甲基甲酰胺 (DMF) (5mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (200 μ L, 1.20mmol) 中。将反应物在RT下搅拌18小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 3个级分 (200mL), 由25%、35%和40%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (250mg, 55.1%产率; TLC R_f=0.19 (30%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=4.739min)。

合成例44:MN1329



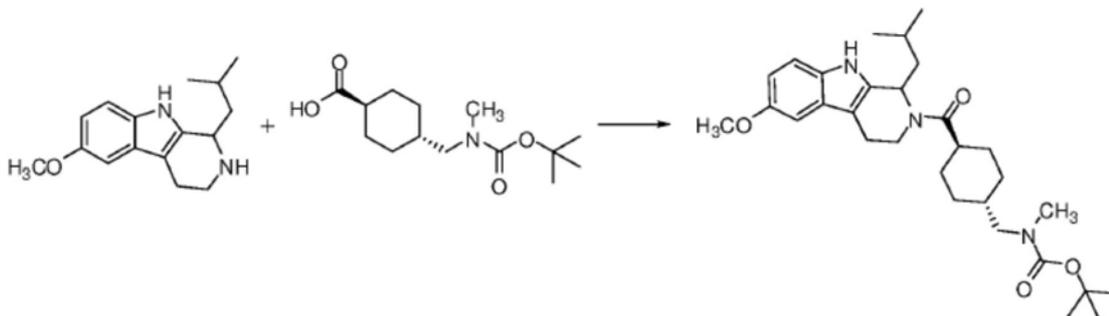
将(4R)-环己基-4-(叔丁氧基羰基氨基)-5-(1-异丁基-3,4-二氢-1H-吡啶基[3,4-b]吡啶-2(9H)-基)-5-氧戊酸酯 (540mg, 1.00mmol) 溶于MeOH (18.4mL) 中。将H₂O (5.3mL) 和LiOH (210mg, 5mmol) 加入混合物中并搅拌。四小时后, 真空除去75%的溶剂。将混合物转移至分液漏斗中, 并用H₂O (25mL) 稀释。用乙醚 (4x 25mL) 洗涤溶液。用1N HCl (5mL) 酸化水层至pH 2 (通过pH试纸测定), 用CH₂Cl₂ (4x 50mL) 萃取。真空除去溶剂, 得到白色固体 (369mg, 80.7%产率; TLC R_f=0.59 (5%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%HOAc); HPLC R_t=4.304min)。

合成例45:MN1330



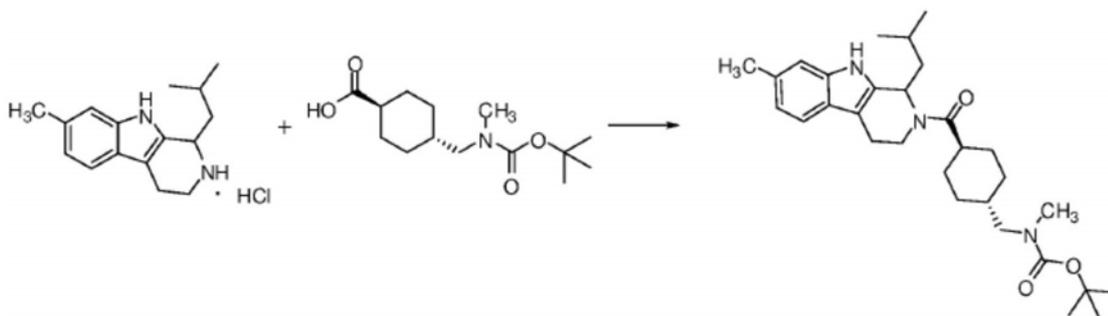
将1-异丁基-7-甲氧基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚(159mg,0.614mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl(EDC-HCl)(118mg,0.614mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(7.5mg,0.0614mmol)、羟基苯并三唑(HOBT)(31mg,0.203mmol)和反-4-(Boc-甲基氨基)环己烷羧酸(167mg,0.614mmol)全部溶解在乙腈(768 μ L)、二甲基甲酰胺(DMF)(3.07mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(122 μ L,0.737mmol)中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc(100mL)稀释反应混合物,用饱和NaCl(2x 50mL)、1M柠檬酸(3x 25mL)、饱和NaHCO₃(3x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:4个级分(200mL),由己烷、30%EtOAc的己烷溶液、40%EtOAc的己烷溶液和50%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(218mg,69.4%产率;TLC_{Rf}=0.33(40%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=5.031min)。

合成例46:MN1331



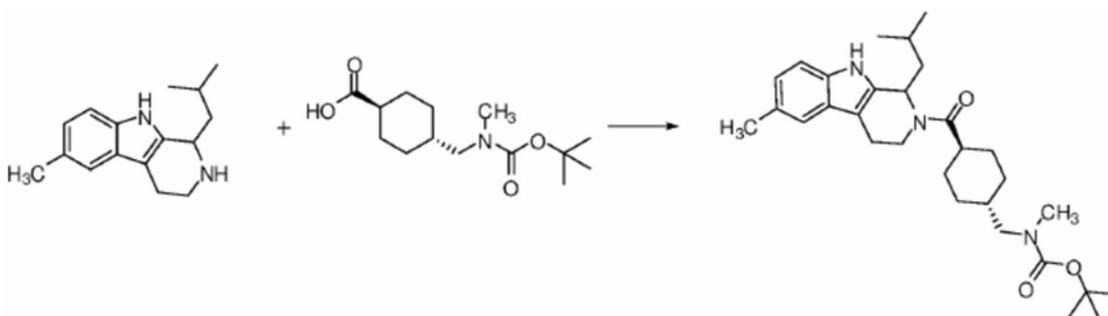
将1-异丁基-6-甲氧基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚(159mg,0.614mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl(EDC-HCl)(118mg,0.614mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(7.5mg,0.0614mmol)、羟基苯并三唑(HOBT)(31mg,0.203mmol)和反-4-(Boc-甲基氨基)环己烷羧酸(167mg,0.614mmol)全部溶解在乙腈(768 μ L)、二甲基甲酰胺(DMF)(3.07mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(122 μ L,0.737mmol)中。将该反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc(100mL)稀释反应混合物,用饱和NaCl(2x 50mL)、1M柠檬酸(3x 25mL)、饱和NaHCO₃(3x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:4个级分(200mL),由己烷、15%EtOAc的己烷溶液、25%EtOAc的己烷溶液和35%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(159mg,50.6%产率;TLC R_f=0.15(30%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=4.986min)。

合成例47:MN1332



将1-异丁基-7-甲基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚·HCl (171mg, 0.614mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (118mg, 0.614mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (7.5mg, 0.0614mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (31mg, 0.203mmol) 和反-4-(Boc-甲基氨基)环己烷羧酸 (167mg, 0.614mmol) 全部溶解在乙腈 (768 μ L)、二甲基甲酰胺 (DMF) (3.07mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (122 μ L, 0.737mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 3个级分 (200mL), 由20%、25%和35%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 真空下干燥溶剂, 得到固体 (238mg, 78.2%产率; TLC R_f=0.22 (30%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=5.231min); LCMS+ESI (14.555-14.672min), 496.3594 (M+1), 518.3415 (M+23); ¹H NMR (CDCl₃, 0.003% v/v TMS, 400MHz): δ_{H} 0.90-1.15 (9H, m), 1.46 (9H, s), 1.52-1.94 (10H, m), 2.56 (1H, t), 2.72-2.90 (5H, m), 2.97-3.21 (2H, m), 3.42-3.54 (1H, m), 4.10 (1H, d), 5.88 (1H, q), 7.05 (1H, dd), 7.28-7.39 (2H, m), 7.97 (1H, br s)。

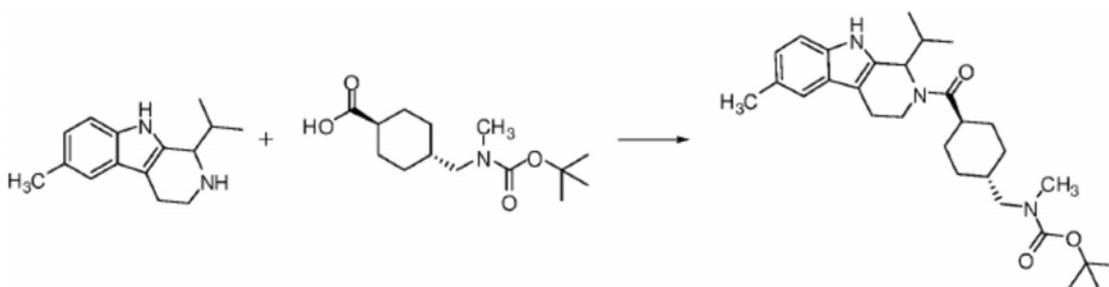
合成例48:MN1333



将1-异丁基-6-甲基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 (150mg, 0.614mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (118mg, 0.614mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (7.5mg, 0.0614mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (31mg, 0.203mmol) 和反-4-(Boc-甲基氨基)环己烷羧酸 (167mg, 0.614mmol) 全部溶解在乙腈 (768 μ L)、二甲基甲酰胺 (DMF) (3.07mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (122 μ L, 0.737mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 4个级分 (200mL), 由己烷、15%EtOAc的己烷溶液、25%EtOAc的己烷溶液和35%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (233mg, 76.6%产率; TLC R_f=0.32 (30%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=

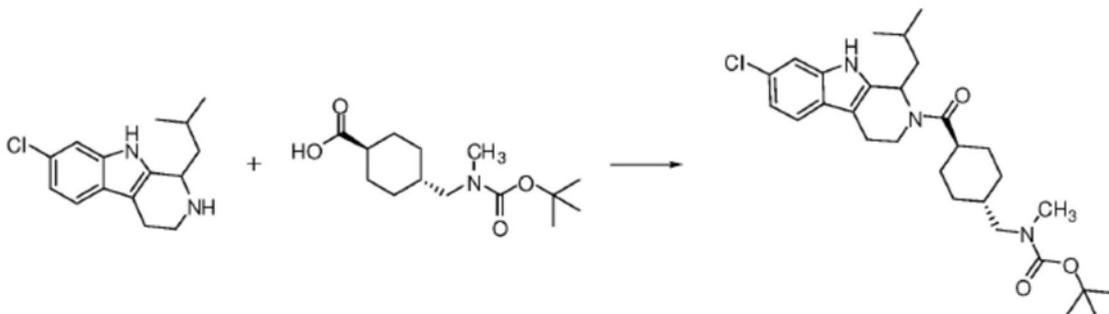
5.238min)。

合成例49:MN1334



将1-异丙基-6-甲基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚(140mg,0.614mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (118mg,0.614mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP) (7.5mg,0.0614mmol)、羟基苯并三唑(HOBT) (31mg,0.203mmol)和反-4-(Boc-甲基氨基甲基)环己烷羧酸(167mg,0.614mmol)全部溶解在乙腈(768 μ L)、二甲基甲酰胺(DMF) (3.07mL)和二异丙基乙胺(DIEA) (122 μ L,0.737mmol)中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物,用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL)和饱和NaCl (50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:4个级分(200mL),由己烷、30%EtOAc的己烷溶液、40%EtOAc的己烷溶液和50%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(191mg,64.6%产率;TLC R_f=0.35 (40%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=5.081min)。

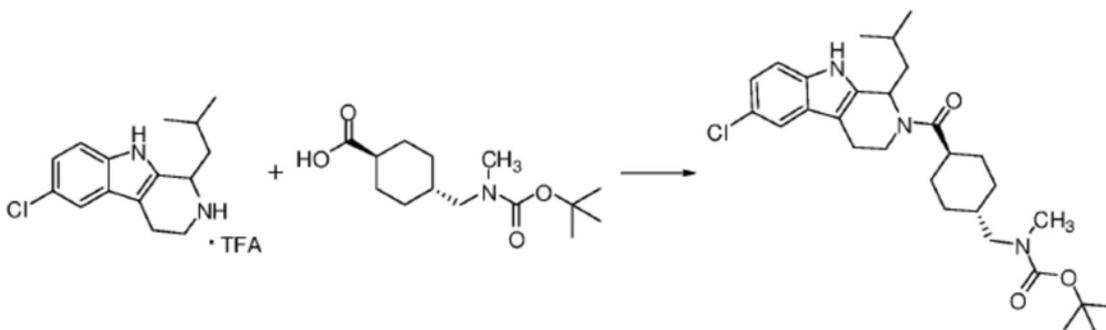
合成例50:MN1335



将7-氯-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚(161mg,0.614mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (118mg,0.614mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP) (7.5mg,0.0614mmol)、羟基苯并三唑(HOBT) (31mg,0.203mmol)和反-4-(Boc-甲基氨基甲基)环己烷羧酸(167mg,0.614mmol)全部溶解在乙腈(768 μ L)、二甲基甲酰胺(DMF) (3.07mL)和二异丙基乙胺(DIEA) (122 μ L,0.737mmol)中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物,用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL)和饱和NaCl (50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:4个级分(200mL),由己烷、15%EtOAc的己烷溶液、25%EtOAc的己烷溶液和35%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,真空下干燥溶剂,得到固体(250mg,78.9%产率;TLC R_f=0.30 (30%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=5.282min);LCMS+ESI (14.672-14.905min),516.3049 (M+1),538.2867 (M+23);¹H NMR (CDCl₃,0.003%

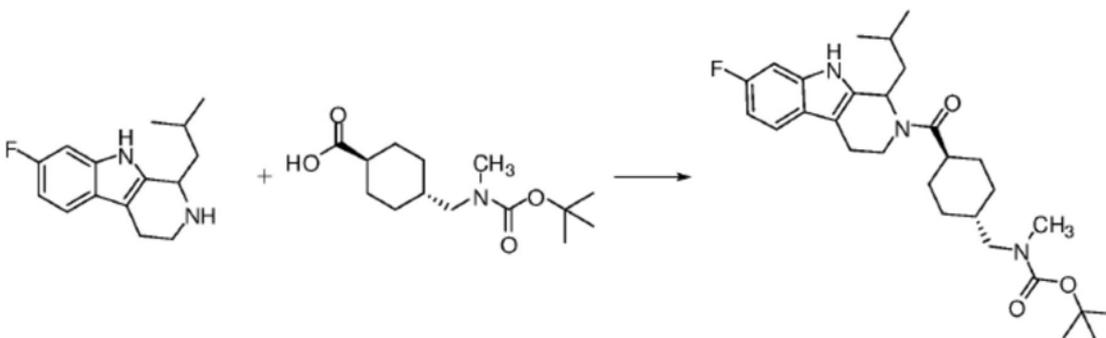
v/v TMS, 400MHz): δ H 0.94-1.15 (8H, m), 1.41 (9H, s), 1.60-1.94 (10H, m), 2.55 (1H, t), 2.71-2.91 (5H, m), 3.00-3.18 (2H, m), 3.48 (1H, t), 4.07 (1H, d), 5.79-5.91 (1H, m), 6.92 (1H, m), 7.10 (1H, s), 7.32 (1H, d), 7.66 (1H, br s)。

合成例51:MN1336



将6-氯-1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚·TFA盐(221mg, 0.614mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl(EDC-HCl)(118mg, 0.614mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(7.5mg, 0.0614mmol)、羟基苯并三唑(HOBT)(31mg, 0.203mmol)和反-4-(Boc-甲基氨基甲基)环己烷羧酸(167mg, 0.614mmol)全部溶解在乙腈(768 μ L)、二甲基甲酰胺(DMF)(3.07mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(244 μ L, 1.47mmol)中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc(100mL)稀释反应混合物,用饱和NaCl(2x 50mL)、1M柠檬酸(3x 25mL)、饱和NaHCO₃(3x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:己烷(200mL)冲洗,3个级分(200mL),由25%、30%和35%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(92mg, 29.0%产率;TLC R_f=0.20(30%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=5.278min)。

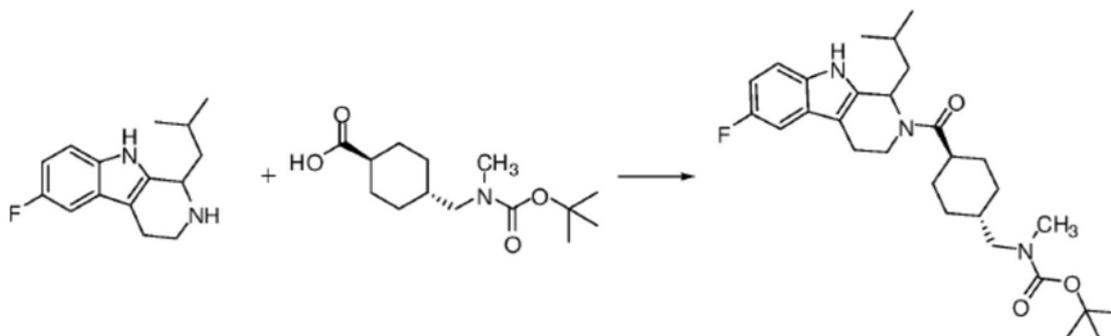
合成例52:MN1337



将7-氟-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚(151mg, 0.614mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl(EDC-HCl)(118mg, 0.614mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(7.5mg, 0.0614mmol)、羟基苯并三唑(HOBT)(31mg, 0.203mmol)和反-4-(Boc-甲基氨基甲基)环己烷羧酸(167mg, 0.614mmol)全部溶解在乙腈(768 μ L)、二甲基甲酰胺(DMF)(3.07mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(122 μ L, 0.737mmol)中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc(100mL)稀释反应混合物,用饱和NaCl(2x 50mL)、1M柠檬酸(3x 25mL)、饱和NaHCO₃(3x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:4个级分(200mL),由己烷、15%EtOAc的己烷溶液、25%

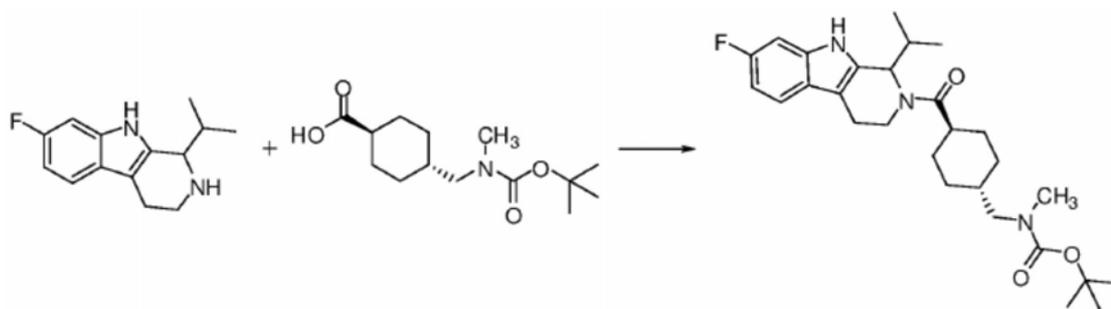
EtOAc的己烷溶液和35%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(159mg,51.8%产率;TLC $R_f=0.28$ (30%EtOAc的己烷溶液);HPLC $R_t=5.124$ min)。

合成例53:MN1338



将6-氟-1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚(151mg,0.614mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl(EDC-HCl)(118mg,0.614mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(7.5mg,0.0614mmol)、羟基苯并三唑(HOBT)(31mg,0.203mmol)和反-4-(Boc-甲基氨基)环己烷羧酸(167mg,0.614mmol)全部溶解在乙腈(768 μ L)、二甲基甲酰胺(DMF)(3.07mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(122 μ L,0.737mmol)中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc(100mL)稀释反应混合物,用饱和NaCl(2x 50mL)、1M柠檬酸(3x 25mL)、饱和NaHCO₃(3x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:4个级分(200mL),由己烷、30%EtOAc的己烷溶液、40%EtOAc的己烷溶液和50%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(100mg,32.6%产率;TLC $R_f=0.42$ (40%EtOAc的己烷溶液);HPLC $R_t=5.106$ min)。

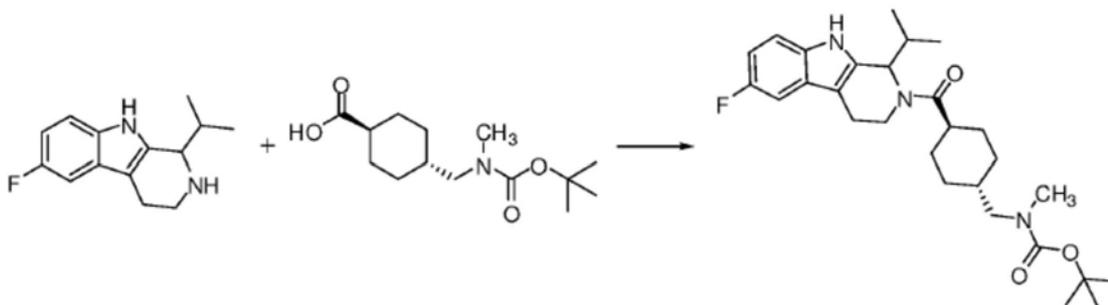
合成例54:MN1339



将7-氟-1-异丙基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚(143mg,0.614mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl(EDC-HCl)(118mg,0.614mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(7.5mg,0.0614mmol)、羟基苯并三唑(HOBT)(31mg,0.203mmol)和反-4-(Boc-甲基氨基)环己烷羧酸(167mg,0.614mmol)全部溶解在乙腈(768 μ L)、二甲基甲酰胺(DMF)(3.07mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(122 μ L,0.737mmol)中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc(100mL)稀释反应混合物,用饱和NaCl(2x 50mL)、1M柠檬酸(3x 25mL)、饱和NaHCO₃(3x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:4个级分(200mL),由己烷、30%EtOAc的己烷溶液、40%EtOAc的己烷溶液和50%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(148mg,49.6%产率;TLC $R_f=0.32$ (40%EtOAc的己烷溶液);HPLC $R_t=$

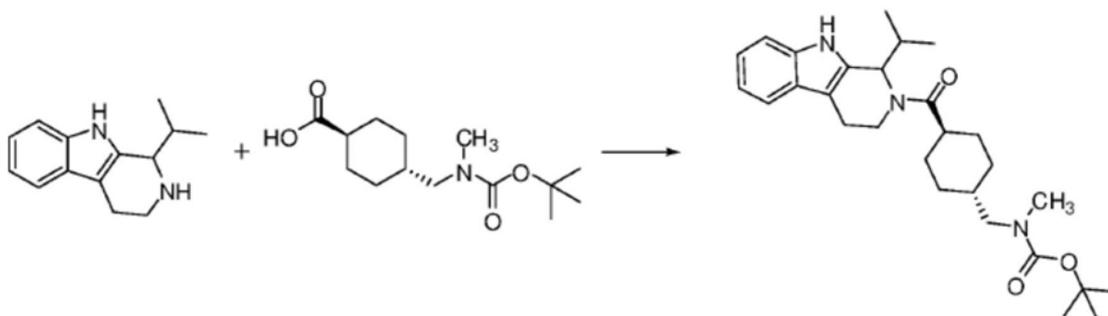
4.966min)。

合成例55:MN1340



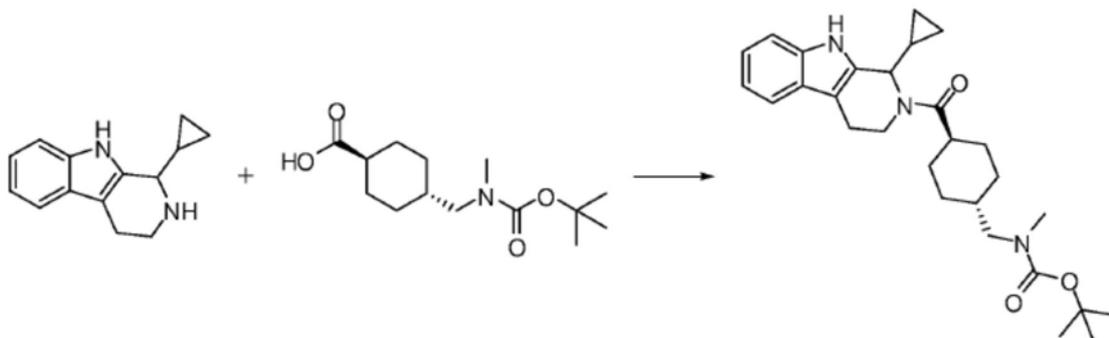
将6-氟-1-异丙基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 (65mg, 0.280mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (54mg, 0.280mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (3.4mg, 0.028mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (14mg, 0.092mmol) 和反-4-(Boc-甲基氨基甲基)环己烷羧酸 (76mg, 0.280mmol) 全部溶解在乙腈 (350 μ L)、二甲基甲酰胺 (DMF) (1.40mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (56 μ L, 0.336mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物,用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化,使用:4个级分 (200mL),由己烷、30%EtOAc的己烷溶液、40%EtOAc的己烷溶液和50%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体 (94mg, 69.1%产率;TLC R_f=0.28 (40%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=4.947min)。

合成例56:MN1341



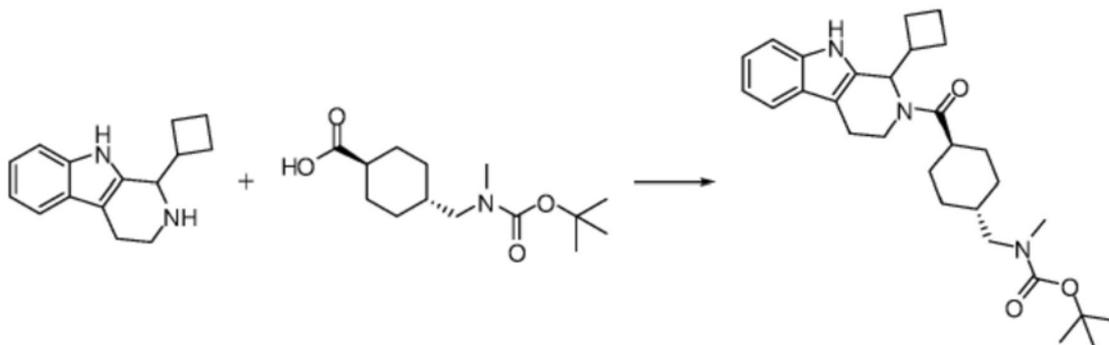
将1-异丙基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 (132mg, 0.614mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐-HCl (EDC-HCl) (118mg, 0.614mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (7.5mg, 0.0614mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (31mg, 0.203mmol) 和反-4-(Boc-甲基氨基甲基)环己烷羧酸 (167mg, 0.614mmol) 全部溶解在乙腈 (768 μ L)、二甲基甲酰胺 (DMF) (3.07mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (122 μ L, 0.737mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物,用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化,使用:4个级分 (200mL),由己烷、30%EtOAc的己烷溶液、40%EtOAc的己烷溶液和50%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体 (215mg, 74.9%产率;TLC R_f=0.12 (30%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=4.928min)。

合成例57:MN1352



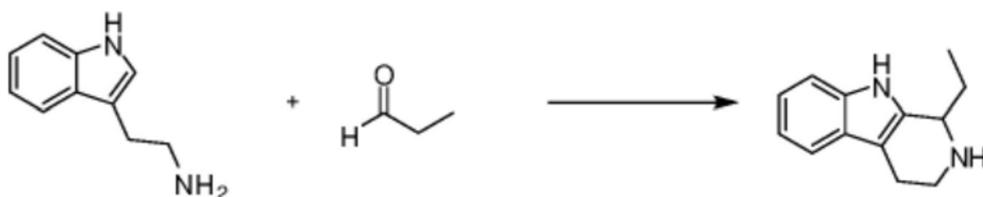
将1-环丙基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 (178mg, 0.84mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (161mg, 0.84mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (10.3mg, 0.084mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (42mg, 0.277mmol) 和反-4-(Boc-甲基氨基甲基)环己烷羧酸 (228mg, 0.84mmol) 全部溶解在乙腈 (1.05μL)、二甲基甲酰胺 (DMF) (4.2mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (167μL, 1.01mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 4个级分 (200mL), 由己烷、25%EtOAc的己烷溶液、35%EtOAc的己烷溶液和45%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (316mg, 80.8%产率; TLC R_f=0.27 (40%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=4.851min)。

合成例58: MN1353



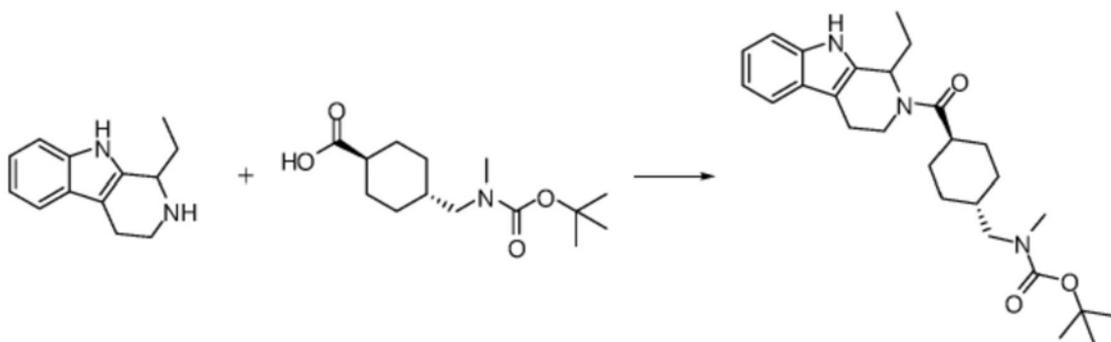
将1-环丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 (190mg, 0.84mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (161mg, 0.84mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (10.3mg, 0.084mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (42mg, 0.277mmol) 和反-4-(Boc-甲基氨基甲基)环己烷羧酸 (228mg, 0.84mmol) 全部溶解在乙腈 (1.05μL)、二甲基甲酰胺 (DMF) (4.2mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (167μL, 1.01mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 4个级分 (200mL), 由己烷、25%EtOAc的己烷溶液、30%EtOAc的己烷溶液和40%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (370mg, 75.7%产率; TLC R_f=0.32 (40%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=5.002min)。

合成例59: MN1355中间体



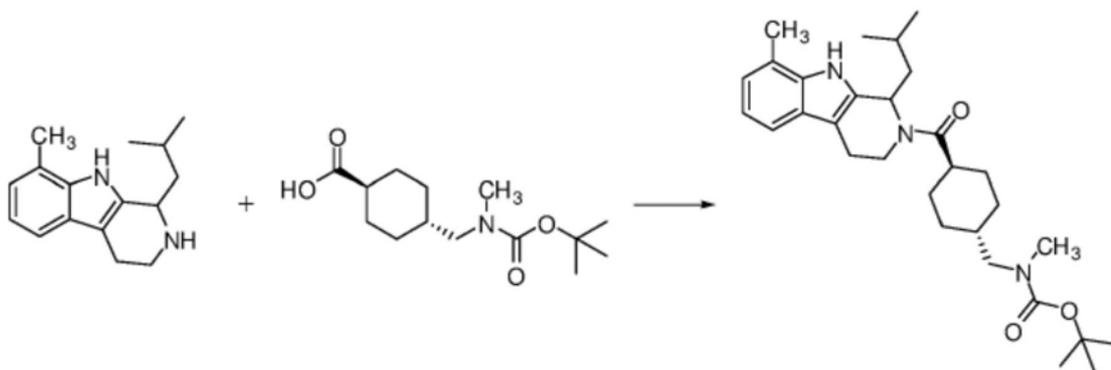
将色胺 (4.00g, 25.0mmol) 溶解在10%水的MeOH溶液中(总共25mL)。经由注射器添加丙醛 (2.7mL, 37.4mmol), 然后通过注射剂缓慢添加浓H₂SO₄ (1.4mL) (当心放热)。将反应物回流过夜。将反应物冷却至室温, 用氢氧化铵碱化, 得到固体。将该固体收集在漏斗上并用己烷 (2x15 mL) 洗涤, 再用乙醚 (2x20 mL) 洗涤。蒸发滤液, 得到粗产物, 将其溶于EtOAc (20mL) 中并过滤。蒸发滤液并将剩余物溶于Et₂O (20mL) 中, 通过0.45um PTFE过滤, 蒸发, 得到2.0g 固体。

合成例59:MN1355



将1-乙基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 (168mg, 0.84mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (161mg, 0.84mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (10.3mg, 0.084mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (42mg, 0.277mmol) 和反-4-(Boc-甲基氨基甲基) 环己烷羧酸 (228mg, 0.84mmol) 全部溶解在乙腈 (1.05mL)、二甲基甲酰胺 (DMF) (4.2mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (167μL, 1.01mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥(无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 4个级分 (200mL), 由己烷、30%EtOAc的己烷溶液、40%EtOAc的己烷溶液和50%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (229mg, 60.1%产率; TLC R_f=0.21 (40%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=4.812min)。

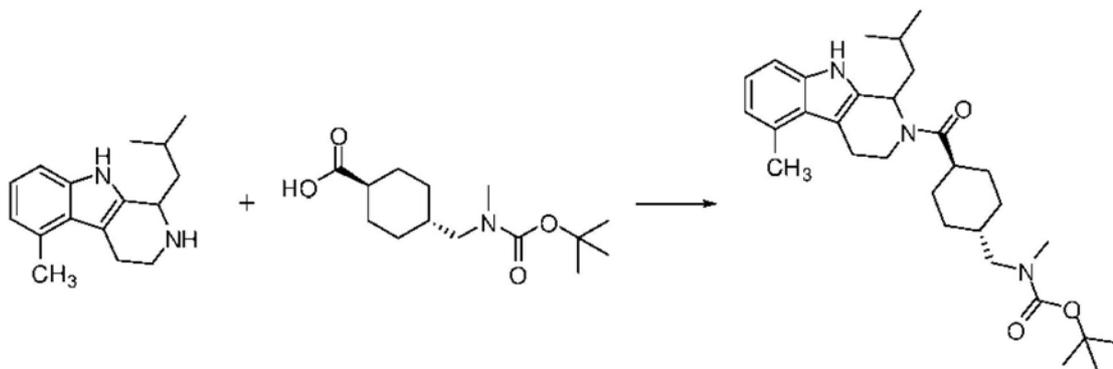
合成例60:MN1356



将1-异丁基-8-甲基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 (204mg, 0.84mmol)、1-乙

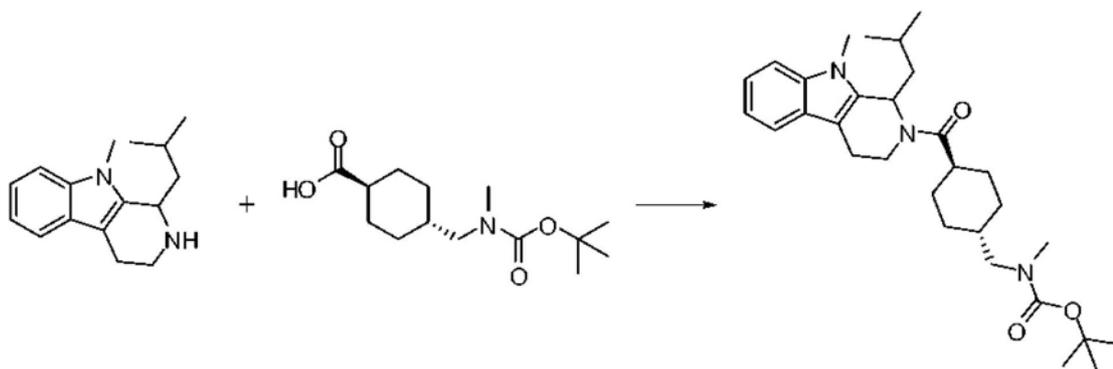
基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (161mg, 0.84mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (10.3mg, 0.084mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (42mg, 0.277mmol) 和反-4-(Boc-甲基氨基)环己烷羧酸 (228mg, 0.84mmol) 全部溶解在乙腈 (1.05mL)、二甲基甲酰胺 (DMF) (4.2mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (167 μ L, 1.01mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 4个级分 (200mL), 由己烷、20%EtOAc的己烷溶液、25%EtOAc的己烷溶液和35%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (266mg, 63.9%产率; TLC R_f=0.22 (30%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=5.247min)。

合成例61: MN1357



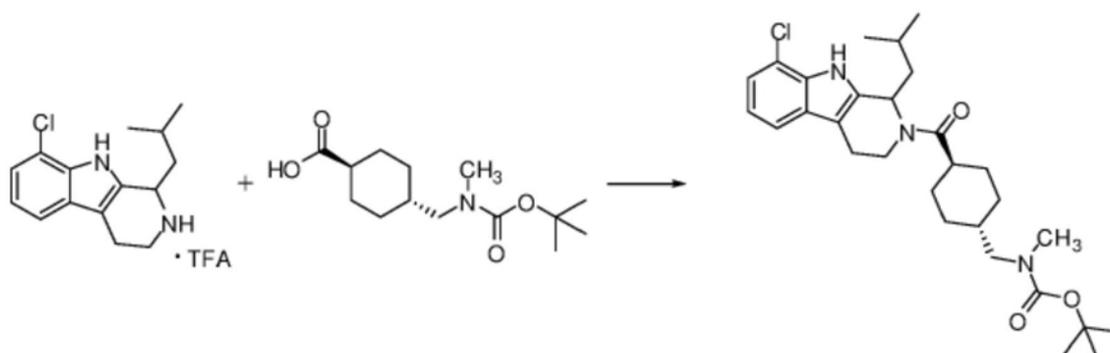
将1-异丁基-5-甲基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 (204mg, 0.84mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (161mg, 0.84mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (10.3mg, 0.084mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (42mg, 0.277mmol) 和反-4-(Boc-甲基氨基)环己烷羧酸 (228mg, 0.84mmol) 全部溶解在乙腈 (1.05mL)、二甲基甲酰胺 (DMF) (4.2mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (167 μ L, 1.01mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 4个级分 (200mL), 由己烷、20%EtOAc的己烷溶液、25%EtOAc的己烷溶液和35%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (370mg, 88.9%产率; TLC R_f=0.22 (30%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=5.197min)。

合成例62: MN1358



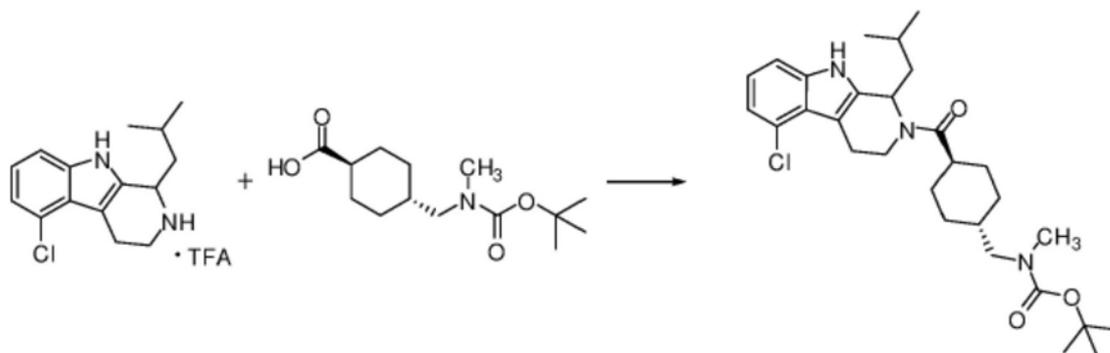
将1-异丁基-9-甲基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶 (204mg, 0.84mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (161mg, 0.84mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (10.3mg, 0.084mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (42mg, 0.277mmol) 和反-4-(Boc-甲基氨基)环己烷羧酸 (228mg, 0.84mmol) 全部溶解在乙腈 (1.05mL)、二甲基甲酰胺 (DMF) (4.2mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (167 μ L, 1.01mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 4个级分 (200mL), 由己烷、20%EtOAc的己烷溶液、25%EtOAc的己烷溶液和35%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (327mg, 78.5%产率; TLC R_f=0.31 (30%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=5.312min)。

合成例63: MN1359



将8-氯-1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶·TFA盐 (168mg, 0.84mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (81mg, 0.42mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (5.1mg, 0.042mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (21mg, 0.139mmol) 和反-4-(Boc-甲基氨基)环己烷羧酸 (114mg, 0.42mmol) 全部溶解在乙腈 (525 μ L)、二甲基甲酰胺 (DMF) (2.1mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (83 μ L, 0.50mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 4个级分 (200mL), 由己烷、20%EtOAc的己烷溶液、25%EtOAc的己烷溶液和35%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (183mg, 84.4%产率; TLC R_f=0.32 (30%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=5.321min)。

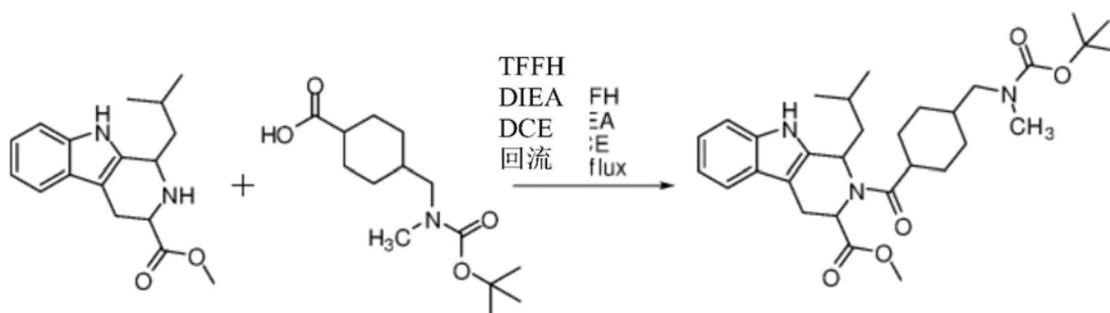
合成例64: MN1360



将5-氯-1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶·TFA盐(158mg,0.42mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl(EDC-HCl)(81mg,0.42mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(5.1mg,0.042mmol)、羟基苯并三唑(HOBT)(21mg,0.139mmol)和反-4-(Boc-甲基氨基)环己烷羧酸(114mg,0.42mmol)全部溶解在乙腈(525 μ L)、二甲基甲酰胺(DMF)(2.1mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(83 μ L,0.50mmol)中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc(100mL)稀释反应混合物,用饱和NaCl(2x 50mL)、1M柠檬酸(3x 25mL)、饱和NaHCO₃(3x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:4个级分(200mL),由己烷、20%EtOAc的己烷溶液、25%EtOAc的己烷溶液和35%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(135mg,62.3%产率;TLC R_f=0.19(30%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=5.327min)。

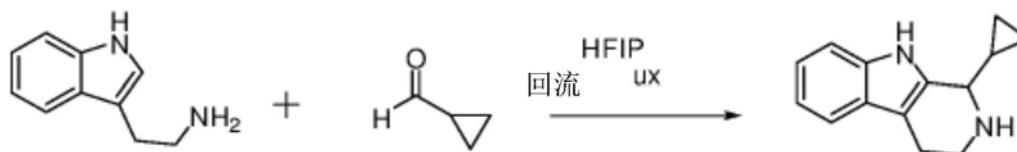
62.3%yield;TLC R_f=0.19(30%EtOAc in Hexane);HPLC R_t=5.327min)。

合成例65:MN1369



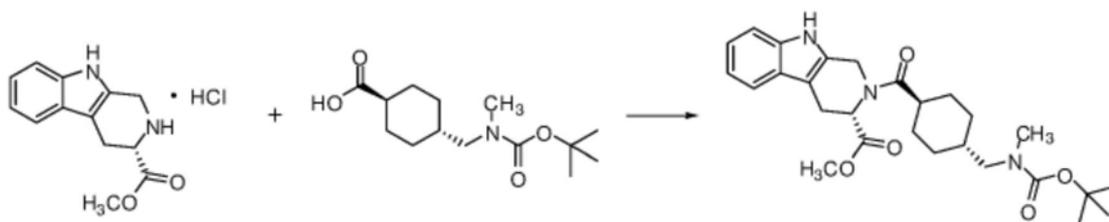
将Boc-N-甲基-氨甲环酸(176mg,0.65mmol)和四甲基氟代脲六氟磷酸酯(TFFH)(198mg,0.75mmol)溶解在1,2-二氯乙烷(DCE)(2.25mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(372 μ L,2.25mmol)。将其在室温下搅拌30分钟,然后加入1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶-3-羧酸甲酯(143mg,0.5mmol)。将反应物在80 $^{\circ}$ C下回流1小时,然后加入Boc-N-甲基-氨甲环酸(176mg,0.65mmol)、四甲基氟代脲六氟磷酸酯(TFFH)(198mg,0.75mmol)、二异丙基乙胺(372 μ L,2.25mmol)和1,2-二氯乙烷(2.25mL)。将其在80 $^{\circ}$ C回流1.5小时,然后与甲苯(3x 50mL)共沸。通过硅胶色谱法进一步纯化粗产物:回收产物为固体(141mg,52%)。

合成例65:MN1342



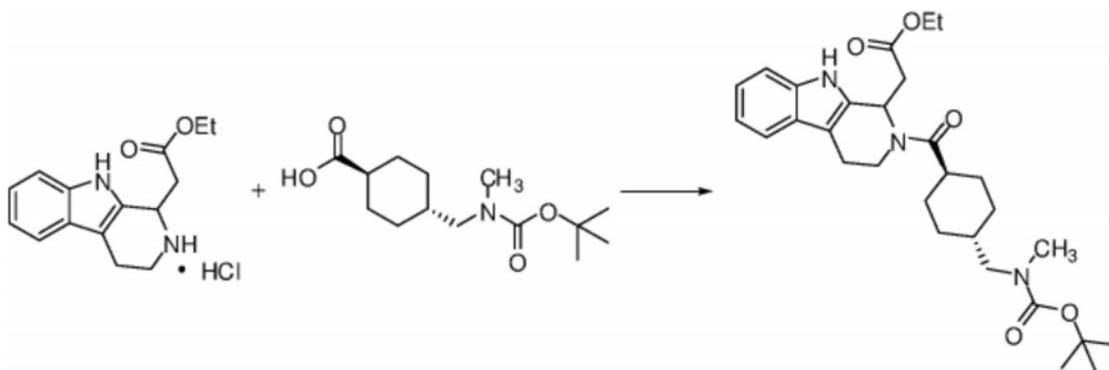
将色胺(801mg,5mmol)溶于1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇(HFIP)(8mL)中,然后通过注射器添加环丙烷甲醛(415 μ L,5.5mmol)。将反应物回流过夜。真空浓缩所得物并与CHCl₃(3x 50mL)共沸。将所得粗产物用己烷(2x 10mL)研磨,并将固体收集在过滤器上(899mg,85%)。

合成例66:MN1362(EDC偶联)



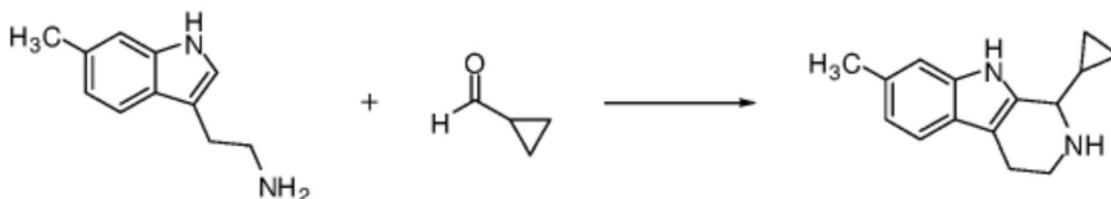
将L-1,2,3,4-四氢-β-咔啉-3-羧酸甲酯·HCl (267mg, 1.00mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP) (12mg, 0.1mmol)、羟基苯并三唑(HOBT) (51mg, 0.33mmol)和反-4-(Boc-甲基氨基)环己烷羧酸(271mg, 1.00mmol)全部溶解在乙腈(1.25mL)、二甲基甲酰胺(DMF) (5mL)和二异丙基乙胺(DIEA) (396μL, 2.4mmol)中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物,用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸(3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL)和饱和NaCl (50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:由己烷和EtOAc的己烷溶液组成的级分(200mL)。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(280mg, 57.9%产率; TLC_{Rf}=0.14 (40%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=4.507min)。

合成例67: MN1363 (EDC偶联)



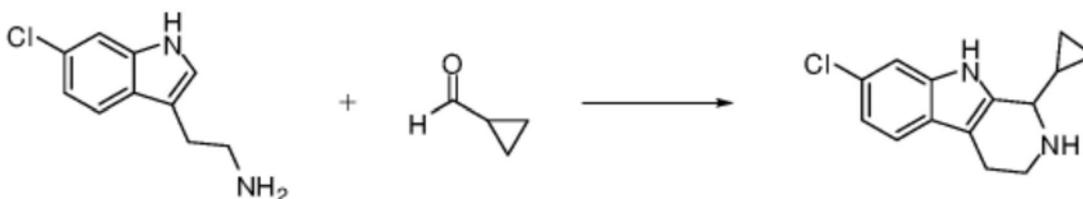
将2-(2,3,4,9-四氢-1H-β并[2,1-c]吡啶-1-基)乙酸乙酯·HCl (160mg, 0.42mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐·HCl (EDC-HCl) (81mg, 0.42mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP) (5.1mg, 0.042mmol)、羟基苯并三唑(HOBT) (21mg, 0.139mmol)和反-4-(Boc-甲基氨基)环己烷羧酸(114mg, 0.42mmol)全部溶解在乙腈(525μL)、二甲基甲酰胺(DMF) (2.1mL)和二异丙基乙胺(DIEA) (83μL, 0.50mmol)中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物,用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸(3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL)和饱和NaCl (50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:4个级分(200mL),由己烷、35%EtOAc的己烷溶液、45%EtOAc的己烷溶液和65%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(116mg, 54.1%产率; TLC R_f=0.20 (40%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=4.846min)。

合成例68: 中间体(HFIP环化)



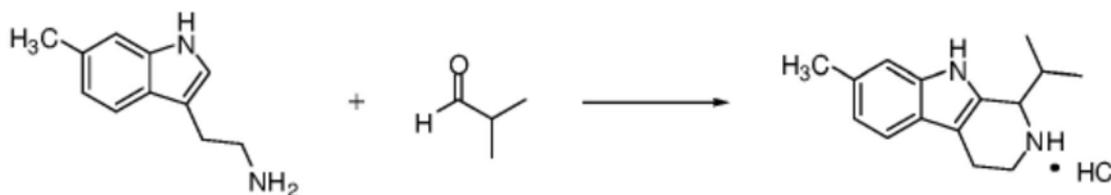
将6-甲基色胺 (380mg, 2.18mmol) 溶解在1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇 (3.5mL) 中。通过注射器添加环丙烷甲醛 (96 μ L, 2.62mmol)。将反应物置于60 $^{\circ}$ C的铝加热块中16小时。真空除去溶剂并与CHCl₃ (3x 50mL) 共沸。过滤产物, 真空干燥, 得到固体 (413mg, 83.7%产率; TLC R_f = 0.23 (5%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%NH₃); HPLC R_t = 2.942min。

合成例69: 中间体 (HFIP环化)



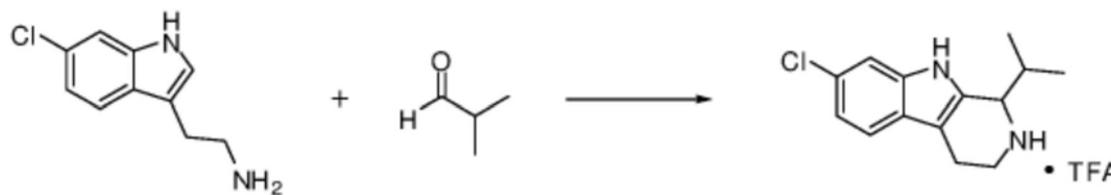
将6-氯色胺 (424mg, 2.18mmol) 溶解在1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇 (3.5mL) 中。通过注射器添加环丙烷甲醛 (196 μ L, 2.62mmol)。将反应物置于60 $^{\circ}$ C的铝加热块中16小时。真空除去溶剂并与CHCl₃ (3x 50mL) 共沸。过滤产物, 真空干燥, 得到固体 (414mg, 77.0%产率; TLC R_f = 0.20 (5%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%NH₃); HPLC R_t = 3.102min。

合成例70: 中间体 (HFIP环化)



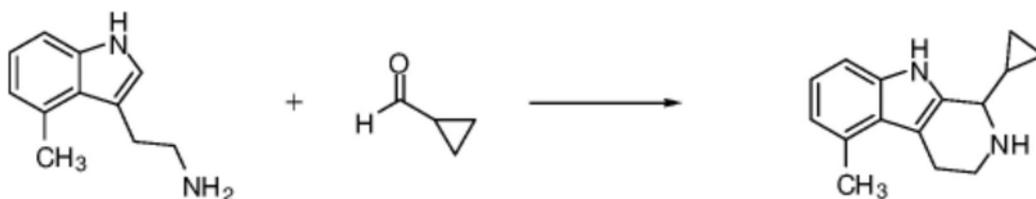
将6-甲基色胺 (370mg, 2.12mmol) 溶解在HFIP (3.4mL) 中。加入异丁醛, 并将反应物在60 $^{\circ}$ C下回流16小时。将反应物在真空下浓缩并与CHCl₃ (3x 50mL) 共沸。过滤所得物并真空干燥, 得到固体 (164mg, 29.2%产率; TLC R_f = 0.20 (5%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%NH₃); HPLC R_t = 3.095min。

合成例71: 中间体 (TFA环化)



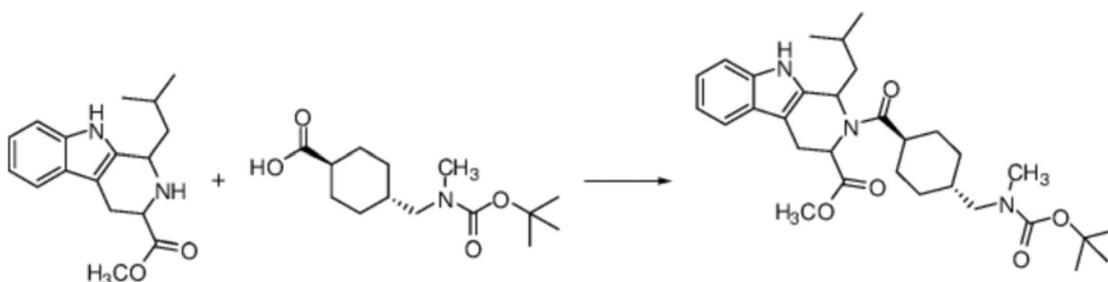
将6-氯色胺 (500mg, 2.57mmol) 溶解在CH₂Cl₂ (21mL) 中。通过注射器将异丁醛 (234 μ L, 2.57mmol) 加入溶液中, 并将混合物置于干冰丙醇浴中5min。在6min内将TFA (1.97mL, 25.7mmol) 滴加到反应混合物中, 然后从冰浴中移出并允许其温热至RT。将反应物与甲苯 (3x 50mL) 共沸并用乙醚 (5x 10mL) 研磨, 得到白色固体 (793mg, 85.1%产率; TLC R_f = 0.25 (5%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%NH₃); HPLC R_t = 3.156min)。

合成例72: 中间体 (HFIP环化)



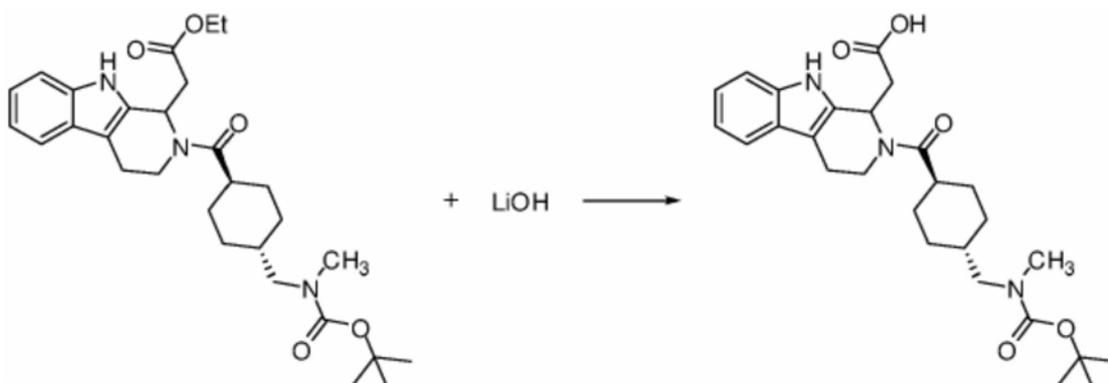
将5-甲基色胺 (172mg, 1.00mmol) 溶解在1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇 (1.6mL) 中。通过注射器添加环丙烷甲醛 (90 μ L, 1.0mmol)。16hr后,真空除去溶剂,并将所得固体与CHCl₃ (3x 50mL) 共沸。将固体溶解在EtOH (5mL) 和Et₂O (60mL) 中,将1N HCl的Et₂O溶液 (1.2mL) 加入溶液。过滤产物,真空干燥,得到固体 (138mg, 61.0%产率; TLC R_f=0.21 (5%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%NH₃); HPLC R_t=2.910min)。

合成例73:MN1369 (使用TFFH的替代偶联方法)



将1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-茛苳并[2,1-c]吡啶-3-羧酸甲酯 (143mg, 0.50mmol)、反-4-(Boc-甲基氨基甲基)环己烷羧酸 (352mg, 1.30mmol) 和四甲基氟代脲六氟磷酸酯 (TFFH) (396mg, 1.50mmol) 溶解在1,2-二氯乙烷 (DCE) (4.50mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (744 μ L, 4.50mmol) 中并搅拌90分钟。将反应混合物与甲苯 (3x 50mL) 共沸。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化,使用:5个级分 (200mL),由CH₂Cl₂、6%EtOAc的CH₂Cl₂溶液、10%EtOAc的CH₂Cl₂溶液、15%EtOAc的CH₂Cl₂溶液和20%EtOAc的CH₂Cl₂溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体 (190mg)。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化,使用:6个级分 (200mL),由己烷、25%EtOAc的己烷溶液、30%EtOAc的己烷溶液、35%EtOAc的己烷溶液、40%EtOAc的己烷溶液和65%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体 (141mg, 52.3%产率; TLC R_f=0.29 (40%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=4.910min)。

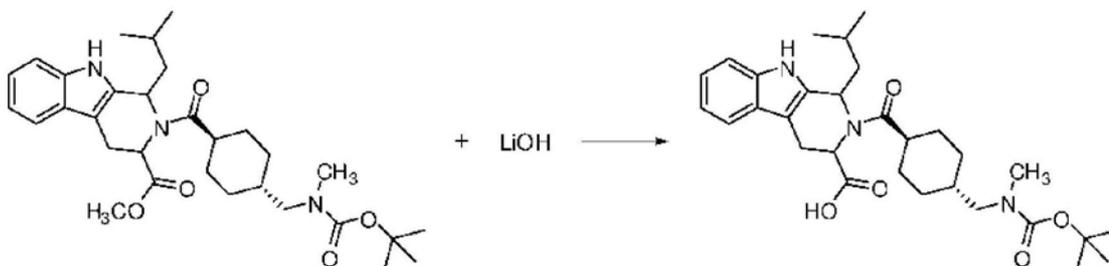
合成例74:MN1370 (酯水解)



将2-(2-(反-4-((叔丁氧基羰基(甲基)氨基)甲基)环己烷羰基)-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶-1-基)乙酸乙酯 (77mg, 0.15mmol) 溶解在MeOH (2.76mL) 中,并通过注射器

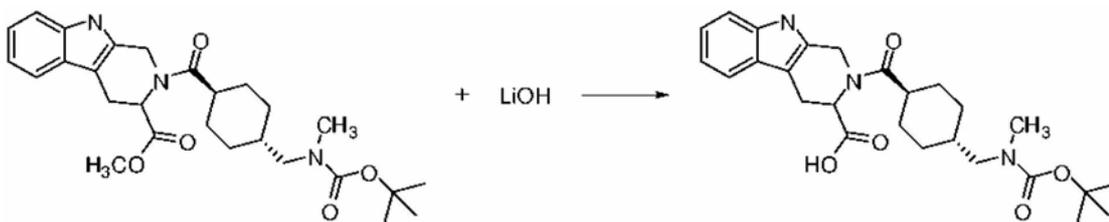
将H₂O (800uL) 添加到混合物中。将LiOH (32mg, 0.75mmol) 加入到混合物中。1hr后通过HPLC 认定反应完成, 并在真空下蒸发溶剂。在H₂O (25mL) 中溶解固体, 用乙醚 (4x 50mL) 洗涤。用1N HCl (5mL) 酸化水层。用CH₂Cl₂ (4x 50mL) 萃取产物, 干燥 (无水MgSO₄), 过滤, 并真空蒸发, 得到固体 (66mg, 91% 产率; TLC R_f = 0.17 (2% MeOH的CH₂Cl₂溶液+1% HOAc); HPLC R_t = 4.373min)。

合成例75: MN1371 (酯水解)



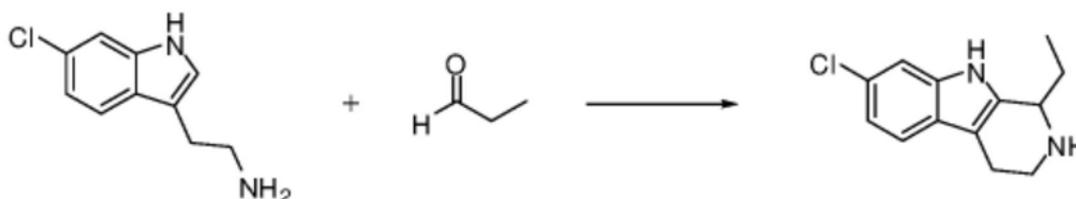
将2-(反-4-((叔丁氧基羰基(甲基)氨基)甲基)环己烷羰基)-1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶-3-羧酸甲酯 (81mg, 0.15mmol) 溶解在MeOH (4.76mL) 中, 并通过注射器将H₂O (800uL) 添加到混合物中。将LiOH (32mg, 0.75mmol) 和二甲基甲酰胺 (DMF) (2mL) 加入到混合物中。23hr后通过HPLC认定反应完成, 并在通风橱下蒸发溶剂。在H₂O (35mL) 中溶解固体, 用乙醚 (4x 50mL) 洗涤。用1N HCl (7mL) 酸化水层。用CH₂Cl₂ (4x 50mL) 萃取产物, 干燥 (无水MgSO₄), 过滤, 并真空蒸发, 得到固体 (66mg, 74% 产率; TLC R_f = 0.36 (2% MeOH的CH₂Cl₂溶液+1% HOAc); HPLC R_t = 4.506min)。

合成例76: MN1372 (酯水解)



将2-(反-4-((叔丁氧基羰基(甲基)氨基)甲基)环己烷羰基)-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶-3-羧酸甲酯 (73mg, 0.15mmol) 溶解在MeOH (2.76mL) 中, 并通过注射器将H₂O (800uL) 添加到混合物中。将LiOH (32mg, 0.75mmol) 加入到混合物中。1hr后通过HPLC认定反应完成, 并在真空下蒸发溶剂。在H₂O (25mL) 中溶解固体, 用乙醚 (4x 50mL) 洗涤。用1N HCl (5mL) 酸化水层。用CH₂Cl₂ (4x 50mL) 萃取产物, 干燥 (无水MgSO₄), 过滤, 并真空蒸发, 得到固体 (63mg, 89% 产率; TLC R_f = 0.15 (2% MeOH的CH₂Cl₂溶液+1% HOAc溶液); HPLC R_t = 4.216min)。

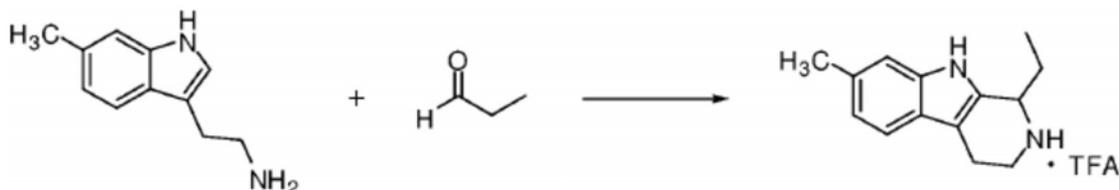
合成例77: 中间体 (H₂SO₄环化)



将6-氯色胺 (389mg, 2.00mmol) 溶解在10%水的MeOH溶液中 (2mL)。通过注射器加入丙

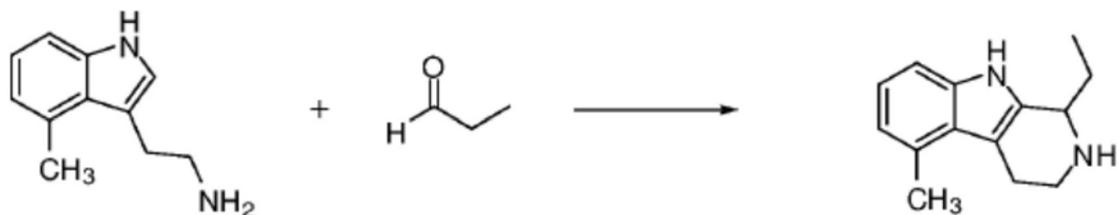
醛 (216 μ L mL, 3.00mmol), 然后通过注射器缓慢加入浓H₂SO₄ (1.4mL)。将反应物回流17hr。将反应物冷却至室温, 然后用氢氧化铵碱化, 得到固体。用己烷 (2x 15mL) 和Et₂O (2x 20mL) 研磨溶液。过滤所得物并蒸发滤液。将所得固体溶解在EtOAc (20mL) 中并过滤。将滤液溶于Et₂O (15mL) 中, 用0.45 μ mPTFE过滤, 并在通风橱下干燥。在氨水 (3mL) 中溶解所得物并用EtOAc (2x 10mL) 萃取。用EtOAc (8mL) 萃取产物, 并用H₂O (3mL)、1N NaOH (1mL) 和饱和NaCl (3mL) 洗涤。干燥所得物, 过滤, 并在真空下除去溶剂。将固体溶解在乙醚 (10mL) 中并过滤。蒸发滤液, 得到固体 (161mg, 34.3%产率; TLC R_f=0.19 (5%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%NH₃); HPLC R_t=3.071min)。

合成例78: 中间体 (TFA环化)



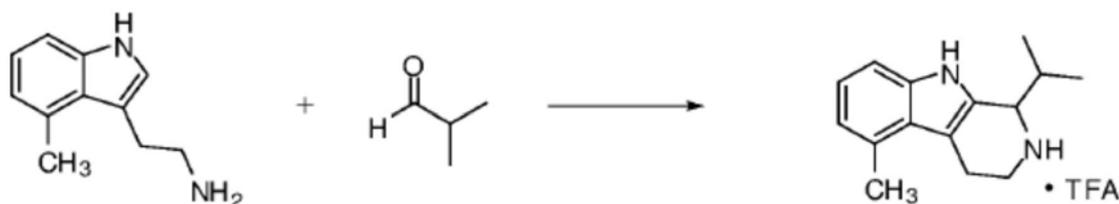
将6-甲基色胺 (360.7mg, 2.07mmol) 溶解在CH₂Cl₂ (16mL) 中。搅拌混合物, 同时通过注射器加入丙醛 (180 μ L, 2.48mmol), 使溶液变澄清。将反应混合物在干冰/2-丙醇浴中冷却5min, 然后在8min内通过注射器滴加10%TFA的CH₂Cl₂溶液 (4.76mL)。将反应物搅拌17hr, 并使其缓慢温热至RT。浓缩混合物并真空干燥, 得到棕色固体。用ACN (2x 2mL) 和EtOAc (2mL) 研磨所得物。在过滤器上收集固体并真空干燥, 得到灰白色固体 (395mg, 61.3%产率; TLC R_f=0.14 (5%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%NH₃); HPLC R_t=2.933min)。

合成例79: 中间体 (TFA环化)



将4-甲基色胺 (348mg, 2.00mmol) 溶解在CH₂Cl₂ (16mL) 中。搅拌混合物, 同时通过注射器加入丙醛 (174 μ L, 2.40mmol), 使溶液变澄清并搅拌5min。将反应混合物在干冰丙醇浴中冷却5min, 然后在8min内通过注射器滴加10%TFA的CH₂Cl₂溶液 (4.6mL)。将反应物搅拌17hr, 并允许其缓慢温热至RT。浓缩混合物并真空干燥, 得到棕色固体。用乙醚 (25x 10mL) 和ACN (10mL) 研磨所得物。在过滤器上收集固体并真空干燥, 得到灰白色固体 (443mg, 103%产率; TLC R_f=0.14 (5%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%NH₃); HPLC R_t=2.916min)。

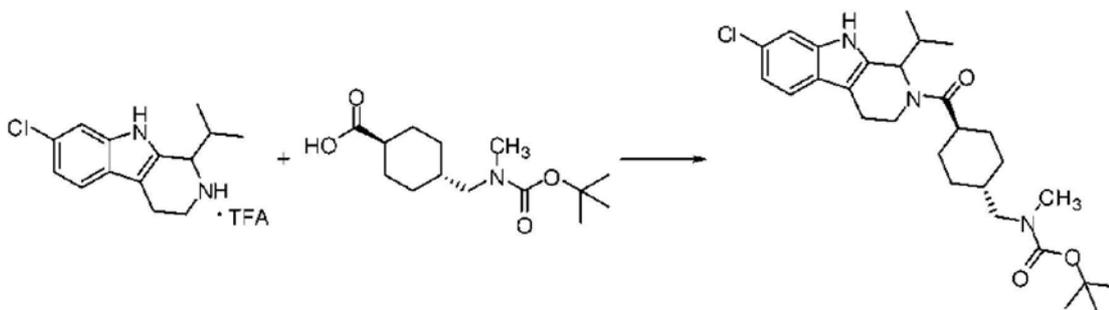
合成例80: 中间体 (TFA环化)



将4-甲基色胺 (174mg, 1.00mmol) 溶解在CH₂Cl₂ (8mL) 中。将异丁醛 (90 μ L, 1.0mmol) 加入溶液中, 并将混合物置于干冰/2-丙醇浴中5min。在2min内将TFA (765 μ L, 10mmol) 滴加到

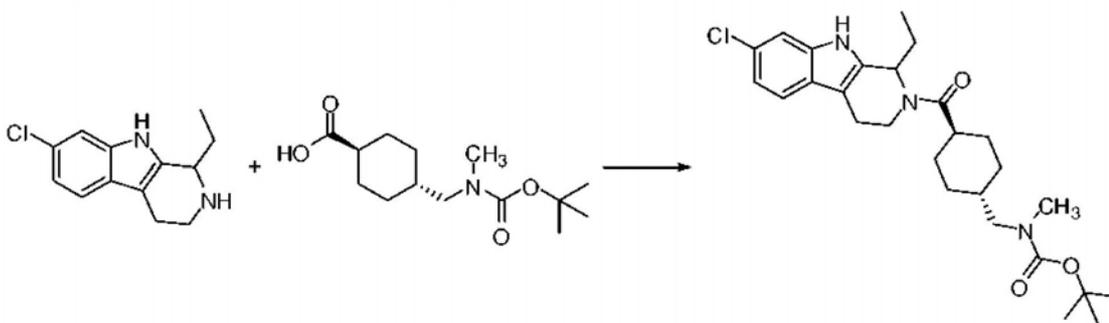
反应混合物中。从干冰浴中移出反应物,并允许其温热至RT 1hr。真空除去溶剂并真空干燥所得红色油状物质。将所得物与甲苯 (3x 50mL) 共沸并用Et₂O (2x 6mL) 和ACN研磨,得到固体 (183mg, 56.2%产率; TLC R_f=0.26 (5%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%NH₃); HPLC R_t=3.009min)。

合成例81: MN1377 (EDC偶联)



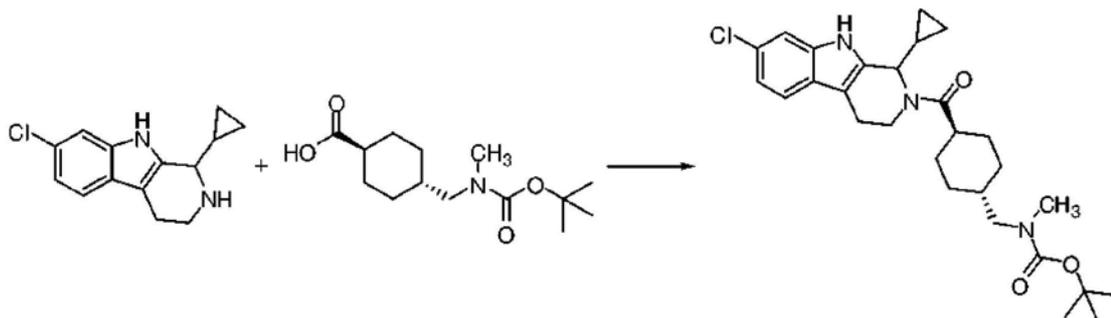
将7-氯-1-异丙基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶·TFA盐 (181mg, 0.50mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (96mg, 0.50mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (6mg, 0.05mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (51mg, 0.165mmol) 和反-4-(Boc-甲基氨基甲基) 环己烷羧酸 (136mg, 0.50mmol) 全部溶解在乙腈 (625μL)、二甲基甲酰胺 (DMF) (2.5mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (100μL, 0.60mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物,用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化,使用:4个级分 (200mL),由己烷、30%EtOAc的己烷溶液、40%EtOAc的己烷溶液和45%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体 (200mg, 79.7%产率; TLC R_f=0.29 (40%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=5.103min)。

合成例82: MN1378 (EDC偶联)



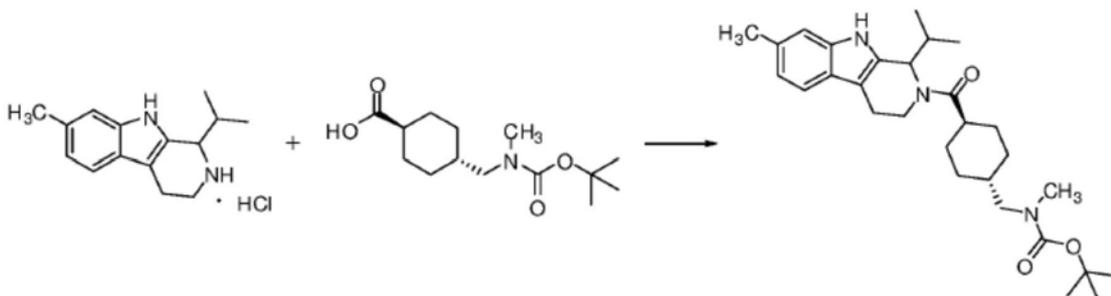
将7-氯-1-乙基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶 (117mg, 0.50mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (96mg, 0.50mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (6mg, 0.05mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (51mg, 0.165mmol) 和反-4-(Boc-甲基氨基甲基) 环己烷羧酸 (136mg, 0.50mmol) 全部溶解在乙腈 (625μL)、二甲基甲酰胺 (DMF) (2.5mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (100μL, 0.60mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物,用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化,使用:4个级分 (200mL),由己烷、30%EtOAc的己烷溶液、40%EtOAc的己烷溶液和45%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体 (187mg, 76.6%产率; TLC R_f=0.18 (40%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=4.978min)。

合成例83:MN1379 (EDC偶联)



将7-氯-1-环丙基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 (123mg, 0.50mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (96mg, 0.50mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (6mg, 0.05mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (51mg, 0.165mmol) 和反-4-(Boc-甲基氨基甲基)环己烷羧酸 (136mg, 0.50mmol) 全部溶解在乙腈 (625 μ L)、二甲基甲酰胺 (DMF) (2.5mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (100 μ L, 0.60mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 4个级分 (200mL), 由己烷、30%EtOAc的己烷溶液、40%EtOAc的己烷溶液和45%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (128mg, 51.2%产率; TLC R_f=0.23 (40%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=5.008min)。

合成例84:MN1380 (EDC偶联)



将1-异丙基-7-甲基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 · HCl (132mg, 0.50mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (96mg, 0.50mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (6mg, 0.05mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (51mg, 0.165mmol) 和反-4-(Boc-甲基氨基甲基)环己烷羧酸 (136mg, 0.50mmol) 全部溶解在乙腈 (625 μ L)、二甲基甲酰胺 (DMF) (2.5mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (200 μ L, 1.20mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 4个级分 (200mL), 由己烷、32%EtOAc的己烷溶液、42%EtOAc的己烷溶液和65%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (200mg, 83.0%产率; TLC R_f=0.25 (40%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=5.034min)。

合成例85:MN1381 (EDC偶联)

将1-乙基-7-甲基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚 · TFA盐 (164mg, 0.50mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (96mg, 0.50mmol)、4-二甲氨基吡啶

(DMAP) (6mg, 0.05mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (51mg, 0.165mmol) 和反-4- (Boc-甲基氨基甲基) 环己烷羧酸 (136mg, 0.50mmol) 全部溶解在乙腈 (625 μ L)、二甲基甲酰胺 (DMF) (2.5mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (100 μ L, 0.60mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 4个级分 (200mL), 由己烷、32%EtOAc的己烷溶液、42% EtOAc的己烷溶液和50%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (202mg, 86.4%产率; TLC R_f=0.21 (40%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=4.913min)。

合成例86: MN1382 (EDC偶联)

将1-环丙基-7-甲基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶 (113mg, 0.50mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (96mg, 0.50mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (6mg, 0.05mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (51mg, 0.165mmol) 和反-4- (Boc-甲基氨基甲基) 环己烷羧酸 (136mg, 0.50mmol) 全部溶解在乙腈 (625 μ L)、二甲基甲酰胺 (DMF) (2.5mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (100 μ L, 0.60mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 4个级分 (200mL), 由己烷、32%EtOAc的己烷溶液、42% EtOAc的己烷溶液和50%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (217mg, 90.5%产率; TLC R_f=0.26 (40%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=4.939min)。

合成例: MN1376中间体 (TFA环化)

将4-甲基色胺 (174mg, 1.00mmol) 溶解在CH₂Cl₂ (8mL) 中。搅拌混合物, 同时通过注射器加入异丁醛 (91 μ L, 1.00mmol), 使溶液变澄清并搅拌5min。将反应混合物在干冰丙醇浴中冷却5min, 然后在2min内通过注射器滴加三氟乙酸 (765 μ L, 10.00mmol)。将反应物搅拌1hr, 并允许其缓慢温热至RT。浓缩混合物并真空干燥, 得到红色固体。将所得物与甲苯 (3x 50mL) 共沸, 并与乙醚 (2x 6mL) 和ACN (10mL) 一起研磨。在过滤器上收集固体并真空干燥, 得到1-异丙基-5-甲基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶 (183mg, 56.2%产率; TLC R_f=0.71 (20%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%NH₃); HPLC R_t=3.064min)。

合成例: MN1383 (EDC偶联)

将1-异丙基-5-甲基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶 (171mg, 0.50mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (96mg, 0.50mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (6mg, 0.05mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (25mg, 0.165mmol) 和反-4- (Boc-甲基氨基甲基) 环己烷羧酸 (136mg, 0.50mmol) 全部溶解在乙腈 (625 μ L)、二甲基甲酰胺 (DMF) (2.5mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (100 μ L, 0.60mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 3个级分 (200mL), 由己烷、32%EtOAc的己烷溶液、42% EtOAc的己烷溶液和50%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (155mg, 64.4%产率; TLC R_f=0.28 (40%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=4.993min)。

合成例88: MN1384 (EDC偶联)

将1-乙基-5-甲基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶·TFA盐(164mg,0.50mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl(EDC-HCl)(96mg,0.50mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(6mg,0.05mmol)、羟基苯并三唑(HOBT)(51mg,0.165mmol)和反-4-(Boc-甲基氨基)环己烷羧酸(136mg,0.50mmol)全部溶解在乙腈(625 μ L)、二甲基甲酰胺(DMF)(2.5mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(100 μ L,0.60mmol)中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc(100mL)稀释反应混合物,用饱和NaCl(2x 50mL)、1M柠檬酸(3x 25mL)、饱和NaHCO₃(3x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:4个级分(200mL),由己烷、32%EtOAc的己烷溶液、42%EtOAc的己烷溶液和50%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(203mg,86.9%产率;TLC R_f=4.877(40%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=0.19min)。

合成例89:MN1385(EDC偶联)

将5-环丙基-5-甲基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶(131mg,0.50mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐-HCl(EDC-HCl)(96mg,0.50mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(6mg,0.05mmol)、羟基苯并三唑(HOBT)(51mg,0.165mmol)和反-4-(Boc-甲基氨基)环己烷羧酸(136mg,0.50mmol)全部溶解在乙腈(625 μ L)、二甲基甲酰胺(DMF)(2.5mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(200 μ L,1.20mmol)中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc(100mL)稀释反应混合物,用饱和NaCl(2x 50mL)、1M柠檬酸(3x 25mL)、饱和NaHCO₃(3x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:4个级分(200mL),由己烷、32%EtOAc的己烷溶液、42%EtOAc的己烷溶液和50%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(212mg,88.4%产率;TLC R_f=0.26(40%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=4.909min)。

合成例90:MN1386(氨基甲酸酯形成)

将(1-异丙基-3,4-二氢-1H-吡啶基[3,4-b]吡啶-2(9H)-基)(反-4-((甲氨基)甲基)环己基)甲酮(110mg,0.30mmol)溶解于CH₂Cl₂(4.5mL)中,并在冰浴中冷却5min。向溶液中滴加氯甲酸异丙酯(150 μ L,0.30mmol)、然后是三乙胺(TEA)(167 μ L,1.20mmol)。将反应混合物温热至RT并蒸发溶剂。将所得固体溶解在EtOAc(200mL)中,并用1N NaOH(3x 50mL)、1N HCl(3x 50mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用由己烷和EtOAc的己烷溶液组成的级分(200mL)。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(131mg,96.3%产率;TLC R_f=0.43(50%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=4.769min)。

合成例91:MN1387(氨基甲酸酯形成)

将(1-异丙基-3,4-二氢-1H-吡啶基[3,4-b]吡啶-2(9H)-基)(反-4-((甲氨基)甲基)环己基)甲酮(110mg,0.30mmol)溶解于CH₂Cl₂(4.5mL)中,并在冰浴中冷却5min。向溶液中滴加氯甲酸苄酯(176 μ L,0.30mmol)、然后是三乙胺(TEA)(167 μ L,1.20mmol)。将反应混合物温热至RT并蒸发溶剂。将所得固体溶解在EtOAc(200mL)中,并用1N NaOH(3x 50mL)、1N HCl(3x 50mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用由己烷和EtOAc的己烷溶液组成的级分(200mL)。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(138mg,91.7%产率;TLC R_f=0.46(50%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=4.891min)。

合成例92:MN1388 (酰胺形成)

将(1-异丙基-3,4-二氢-1H-吡啶基[3,4-b]吡啶-2(9H)-基)(反-4-((甲氨基)甲基)环己基)甲酮(220mg,0.60mmol)溶解于CH₂Cl₂(9mL)中,并在冰浴中冷却5min。向溶液中滴加丙酰氯(53uL,0.60mmol)和三乙胺(TEA)(335uL,2.4mmol)。将反应混合物温热至RT并蒸发溶剂。将所得固体溶解在EtOAc(200mL)中,并用1N NaOH(1x 25mL)、1N HCl(1x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:4个级分(200mL),由己烷、75%EtOAc的己烷溶液、90%EtOAc的己烷溶液和EtOAc组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(201mg,76.6%产率;TLC R_f=0.14(70%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=4.292min)。

合成例93:MN1389 (酰胺形成)

将(1-异丙基-3,4-二氢-1H-吡啶基[3,4-b]吡啶-2(9H)-基)(反-4-((甲氨基)甲基)环己基)甲酮(220mg,0.60mmol)溶解于CH₂Cl₂(9mL)中,并在冰浴中冷却5min。向溶液中滴加3,3-二甲基丁酰氯(84uL,0.60mmol)和三乙胺(TEA)(335uL,2.4mmol)。将反应混合物温热至RT并蒸发溶剂。将所得固体溶解在EtOAc(200mL)中,并用1N NaOH(1x 25mL)、1N HCl(1x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:4个级分(200mL),由己烷、50%EtOAc的己烷溶液、60%EtOAc的己烷溶液和70%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(230mg,82.3%产率;TLC R_f=0.17(50%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=4.723min)。

合成例94:MN1390 (酰胺形成)

将(1-异丙基-3,4-二氢-1H-吡啶基[3,4-b]吡啶-2(9H)-基)(反-4-((甲氨基)甲基)环己基)甲酮(220mg,0.60mmol)溶解于CH₂Cl₂(9mL)中,并在冰浴中冷却5min。向溶液中滴加苯乙酰氯(80uL,0.60mmol)和三乙胺(TEA)(335uL,2.4mmol)。将反应混合物温热至RT并蒸发溶剂。将所得固体溶解在EtOAc(200mL)中,并用1N NaOH(1x 25mL)、1N HCl(1x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:4个级分(200mL),由己烷、60%EtOAc的己烷溶液、70%EtOAc的己烷溶液和80%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(221mg,75.8%产率;TLC R_f=0.15(60%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=4.569min)。

合成例95:MN1391 (脲的形成)

将(1-异丙基-3,4-二氢-1H-吡啶基[3,4-b]吡啶-2(9H)-基)(反-4-((甲氨基)甲基)环己基)甲酮(129mg,0.35mmol)溶解于CHCl₃(8.75mL)中,并在冰浴中氮气惰性气氛下冷却5min。将异氰酸乙酯(56uL,0.7mmol)加入溶液中,并将反应混合物温热至RT。浓缩混合物并在真空下干燥。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:4个级分(200mL),由CH₂Cl₂、3%EtOAc的CH₂Cl₂溶液、4%EtOAc的CH₂Cl₂溶液和5%EtOAc的CH₂Cl₂溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(138mg,89.9%产率;TLC R_f=0.23(4%MeOH的CH₂Cl₂溶液);HPLC R_t=4.178min)。

合成例96:MN1392 (Boc基团取代)

将(1-异丙基-3,4-二氢-1H-吡啶基[3,4-b]吡啶-2(9H)-基)(反-4-((甲氨基)甲基)环己基)甲酮(129mg,0.35mmol)溶解于CHCl₃(8.75mL)中,并在冰浴中氮气惰性气氛下冷却

5min。将异氰酸叔丁酯 (82uL, 0.7mmol) 加入溶液中, 并将反应混合物温热至RT。浓缩混合物并在真空下干燥。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 4个级分 (200mL), 由己烷、50%EtOAc的己烷溶液、60%EtOAc的己烷溶液和70%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (152mg, 93.1%产率; TLC $R_f=0.14$ (50%EtOAc的己烷溶液); HPLC $R_t=4.524$ min)。

合成例97: MN1393 (Boc基团取代)

将(1-异丙基-3,4-二氢-1H-吡啶基[3,4-b]吡啶-2(9H)-基)(反-4-((甲氨基)甲基)环己基)甲酮 (129mg, 0.35mmol) 溶解于CHCl₃ (8.75mL) 中, 并在冰浴中氮气惰性气氛下冷却5min。将异氰酸苯酯 (76uL, 0.7mmol) 加入溶液中, 并将反应混合物温热至RT。浓缩混合物并在真空下干燥。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 4个级分 (200mL), 由己烷、50%EtOAc的己烷溶液、60%EtOAc的己烷溶液和70%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (144mg, 84.5%产率; TLC $R_f=0.13$ (50%EtOAc的己烷溶液); HPLC $R_t=4.484$ min)。

合成例98: MN1394 (EDC偶联)

将1-甲基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶 (186mg, 1.00mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (192mg, 1.00mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (12mg, 0.1mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (51mg, 0.33mmol) 和反-4-(Boc-甲基氨甲基)环己烷羧酸 (271mg, 1.00mmol) 全部溶解在乙腈 (1.25mL)、二甲基甲酰胺 (DMF) (5mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (200uL, 1.20mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 4个级分 (200mL), 由己烷、40%EtOAc的己烷溶液、己烷中的52%EtOAc和60%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (342mg, 77.9%产率; TLC $R_f=0.31$ (50%EtOAc的己烷溶液); HPLC $R_t=4.672$ min)。

合成例99: MN1395 (EDC偶联)

将2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶 (172mg, 1.00mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (192mg, 1.00mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (12mg, 0.1mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (51mg, 0.33mmol) 和反-4-(Boc-甲基氨甲基)环己烷羧酸 (271mg, 1.00mmol) 全部溶解在乙腈 (1.25mL)、二甲基甲酰胺 (DMF) (5mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (200uL, 1.20mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物, 用饱和NaCl (2x50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 4个级分 (200mL), 由己烷、40%EtOAc的己烷溶液、60%EtOAc的己烷溶液和70%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (339mg, 79.7%产率; TLC $R_f=0.23$ (50%EtOAc的己烷溶液); HPLC $R_t=4.555$ min)。

合成例100: MN1396 (还原胺化)

将(1-异丙基-3,4-二氢-1H-吡啶基[3,4-b]吡啶-2(9H)-基)(反-4-((甲氨基)甲基)环己基)甲酮 (110mg, 0.30mmol) 和NaBH(OAc)₃ (95mg, 0.45mmol) 溶解于1,2-二氯乙烷 (1,2-DCE) (3mL) 中。加入丙醛 (22uL, 0.30mmol), 将混合物加热至80°C并搅拌4.5hr。用EtOAc

(50mL) 和1M K_2CO_3 稀释反应混合物。用EtOAc (2x 50mL) 萃取水层, 并合并水层。用饱和NaCl (20mL) 洗涤EtOAc层, 干燥(无水 Na_2SO_4), 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 5个级分(200mL), 由 CH_2Cl_2 、4% MeOH的 CH_2Cl_2 溶液+1% NH_3 、5% MeOH的 CH_2Cl_2 溶液+1% NH_3 、7% MeOH的 CH_2Cl_2 溶液+1% NH_3 和9% MeOH的 CH_2Cl_2 溶液+1% NH_3 组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体(50mg, 40.7% 产率; TLC R_f = 0.26 (5% MeOH的 CH_2Cl_2 溶液+1% NH_3); HPLC R_t = 3.735min)。

合成例101: MN1397 (还原胺化)

将(1-异丙基-3,4-二氢-1H-吡啶基[3,4-b]吲哚-2(9H)-基)(反-4-((甲氨基)甲基)环己基)甲酮(110mg, 0.30mmol) 溶解在1,2-二氯乙烷(3mL)中。将3,3-二甲基丁醛(38 μ L, 0.30mmol) 和 $NaBH(OAc)_3$ (64mg, 0.45mmol) 添加至溶液, 搅拌, 并加热至80 $^{\circ}C$ 保持30min。用EtOAc (50mL) 稀释溶液, 并用1M K_2CO_3 (25mL) 洗涤。用EtOAc (2x 50mL) 萃取产物, 用饱和NaCl (1x 20mL) 洗涤, 干燥(无水 Na_2SO_4) 并过滤。真空蒸发溶剂, 得到固体(154mg, 114% 产率; TLC R_f = 0.15 (5% MeOH的 CH_2Cl_2 溶液); HPLC R_t = 4.044min)。

合成例102: MN1398 (还原胺化)

将(1-异丙基-3,4-二氢-1H-吡啶基[3,4-b]吲哚-2(9H)-基)(反-4-((甲氨基)甲基)环己基)甲酮(110mg, 0.30mmol) 溶解于1,2-二氯乙烷(3mL)中。将异戊醛(33 μ L, 0.30mmol) 和 $NaBH(OAc)_3$ (64mg, 0.45mmol) 添加至溶液, 搅拌, 并加热至80 $^{\circ}C$ 30min。用EtOAc (50mL) 稀释溶液, 并用1M K_2CO_3 (25mL) 洗涤。用EtOAc (2x 50mL) 萃取产物, 用饱和NaCl (1x 20mL) 洗涤, 干燥(无水 Na_2SO_4) 并过滤。真空蒸发溶剂, 得到固体(132mg, 101% 产率; TLC R_f = 0.46 (10% MeOH的 CH_2Cl_2 溶液); HPLC R_t = 3.972min)。

合成例102: MN1399 (酰胺形成)

将(1-异丙基-3,4-二氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚-2(9H)-基)(反-4-((甲氨基)甲基)环己基)甲酮(110mg, 0.30mmol) 和 $NaHB(OAc)_3$ (95mg, 0.45mmol) 溶解于1,2-二氯乙烷(1,2-DCE) (3mL)中。加入苯甲醛(31 μ L, 0.30mmol), 将混合物加热至80 $^{\circ}C$ 并搅拌4.5hr。用EtOAc (50mL) 和1M H_2CO_3 稀释反应混合物。用EtOAc (2x 50mL) 萃取水层并合并水层。用饱和NaCl (20mL) 洗涤EtOAc层, 干燥(无水 Na_2SO_4), 过滤, 并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 6个级分(200mL), 由 CH_2Cl_2 、1% MeOH的 CH_2Cl_2 溶液+1% NH_3 、2% MeOH的 CH_2Cl_2 溶液+1% NH_3 、3% MeOH的 CH_2Cl_2 溶液+1% NH_3 、4% MeOH的 CH_2Cl_2 溶液+1% NH_3 和5% MeOH的 CH_2Cl_2 溶液+1% NH_3 组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体(83mg, 60.4% 产率; TLC R_f = 0.26 (5% MeOH的 CH_2Cl_2 溶液+1% NH_3); HPLC R_t = 3.929min)。

合成例104: MN1400 (Boc裂解)

将(反-4-(1-异丙基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吲哚-2-羰基)环己基)甲基(甲基)氨基甲酸叔丁酯(2.2814g, 4.88mmol) 溶解在 CH_2Cl_2 (30mL)中。将三氟乙酸(TFA) (30mL) 添加到溶液中并在30分钟时在真空下浓缩。将所得物溶于 H_2O (80mL) 和 CH_2Cl_2 (100mL) 中并用10M NaOH (1mL) 碱化。用 CH_2Cl_2 (2x100mL) 萃取产物, 干燥(无水 $MgSO_4$), 过滤, 真空除去溶剂, 得到灰白色/黄色固体(1.667g)。将该固体溶于冷乙腈(ACN) (2x 5mL)中, 搅拌30秒, 并过滤。蒸发溶剂, 得到固体(1.38g)。将该固体溶于RT ACN (5mL)中, 搅拌30秒, 并过滤。蒸发溶剂, 得到固体。在RT下在RT ACN (5mL)中搅拌固体4min。蒸发溶剂, 得到固体(707mg, 39.4% 产率; TLC R_f = 0.16 (10% MeOH的 CH_2Cl_2 溶液+1% NH_3); HPLC R_t = 3.559min)。

合成例105:MN1401 (EDC偶联)

将2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶-3-甲酰胺(215mg,1.00mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (192mg,1.00mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP) (12mg,0.1mmol)、羟基苯并三唑(HOBT) (51mg,0.33mmol)和反-4-(Boc-甲基氨基甲基)环己烷羧酸(271mg,1.00mmol)全部溶解在乙腈(1.25mL)、二甲基甲酰胺(DMF) (5mL)和二异丙基乙胺(DIEA) (200 μ L,1.20mmol)中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc(100mL)稀释反应混合物,用饱和NaCl(2x 50mL)、1M柠檬酸(3x 25mL)、饱和NaHCO₃(3x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:7个级分(200mL),由CH₂Cl₂、3%MeOH的CH₂Cl₂溶液、4%MeOH的CH₂Cl₂溶液、4.5%MeOH的CH₂Cl₂溶液、5%MeOH的CH₂Cl₂溶液和6%MeOH的CH₂Cl₂溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(210mg,44.8%产率;TLC R_f=0.15(4%MeOH的CH₂Cl₂溶液);HPLC R_t=4.089min)。

合成例106:MN1402 (EDC偶联)

将2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶-3-羧酸苄酯(306mg,1.00mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (192mg,1.00mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP) (12mg,0.1mmol)、羟基苯并三唑(HOBT) (51mg,0.33mmol)和反-4-(Boc-甲基氨基甲基)环己烷羧酸(271mg,1.00mmol)全部溶解在乙腈(1.25mL)、二甲基甲酰胺(DMF) (5mL)和二异丙基乙胺(DIEA) (200 μ L,1.20mmol)中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc(100mL)稀释反应混合物,用饱和NaCl(2x 50mL)、1M柠檬酸(3x 25mL)、饱和NaHCO₃(3x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:4个级分(200mL),由己烷、30%EtOAc的己烷溶液、40%EtOAc的己烷溶液和55%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(246mg,43.9%产率;TLC R_f=0.24(40%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=4.919min)。

合成例107:MN1403 (EDC偶联)

将3-甲基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶(186mg,1.00mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (192mg,1.00mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP) (12mg,0.1mmol)、羟基苯并三唑(HOBT) (51mg,0.33mmol)和反-4-(Boc-甲基氨基甲基)环己烷羧酸(271mg,1.00mmol)全部溶解在乙腈(1.25mL)、二甲基甲酰胺(DMF) (5mL)和二异丙基乙胺(DIEA) (200 μ L,1.20mmol)中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc(100mL)稀释反应混合物,用饱和NaCl(2x 50mL)、1M柠檬酸(3x 25mL)、饱和NaHCO₃(3x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:4个级分(200mL),由己烷、30%EtOAc的己烷溶液、50%EtOAc的己烷溶液和60%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(352mg,80.1%产率;TLC R_f=0.30(50%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t=4.674min)。

合成例108:MN1404 (HFIP环化)

将 α -甲基色胺(174mg,1.00mmol)溶解在六氟-2-丙醇(HFIP) (1.6mL)中。将多聚甲醛(30mg,1.0mmol)溶于HFIP(1.0mL)中,并以每份250 μ L滴加至前述溶液中。在90分钟内,将反应混合物与CHCl₃(3x 50mL)共沸,得到固体(188mg,101%产率;TLC R_f=0.31(10%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%NH₃);HPLC R_t=2.717min)。

合成例109:MN1405 (HFIP环化)

将D-色氨酸苄酯(400mg, 1.36mmol)溶解在六氟-2-丙醇(HFIP)(2.2mL)中。将多聚甲醛(45mg, 1.49mmol)溶于HFIP(1.61mL)中,在1hr内以每份340uL滴加至前述溶液中并搅拌。20hr后,真空除去溶剂。将反应混合物与CHCl₃(3x50mL)共沸,真空干燥得到固体(3.0mg, 0.72%产率;TLC R_f=0.26(5%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%NH₃);HPLC R_t=3.505min)。

合成例110:MN1406(酯到酰胺)

使用热风枪在真空下将三氟甲磺酸镧(III)(La(O Tf)₃)(80mg, 0.136mmol)加热至200+°C。将氩气回填到管中,并添加L-1,2,3,4-四氢-B-咪啉-3-羧酸甲酯·HCl(520mg, 1.95mmol)。将固体溶解在2N NH₃的EtOH溶液(12mL)中。将反应混合物加盖并加热至60°C保持48hr。将混合物冷却至RT,用0.45um注射器过滤,并在真空下干燥。加入La(Tf)₃(80mg, 0.136mmol),并在90°C加热20min。将滤液溶解在2N NH₃的EtOH溶液中,并在60°C加热3天。蒸发溶剂并将所得固体溶于H₂O(50mL)和EtOAc(20mL)中,用EtOAc(25mL)洗涤,并用H₂O(2x10mL)萃取。蒸发水层。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用由CH₂Cl₂和MeOH和1%NH₃的CH₂Cl₂溶液组成的级分(400mL)。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(48mg, 11.4%产率;TLC R_f=0.26(10%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%NH₃);HPLC R_t=1.460min)。

合成例111:MN1407(酯到羧酸)

将L-1,2,3,4-四氢-B-咪啉-3-羧酸甲酯·HCl(532mg, 2.00mmol)溶解于1N NaOH(20mL)中,并加热至回流30min。将所得物转移到锥形瓶中,并置于冰浴中。冷却后,盐固化,加入1N HCl(23mL)直至pH为5并保留沉淀。在烧结玻璃上收集白色固体。将该固体在干燥器中干燥过夜,并在高真空下进一步干燥2天,得到固体(396mg, 91.6%产率;TLC R_f=0.60(丁醇:水:乙酸[3:1:1]);HPLC R_t=2.418min)。

合成例112:MN1408(酯到酰胺)

在烘箱中将三氟甲磺酸镧(III)(La(O Tf)₃)(20mg, 0.0341mmol)加热至113-114°C 30min。将物质置于高真空下,用热风枪加热2-3分钟,并在真空下冷却至RT。向混合物中加入L-1,2,3,4-四氢-B-咪啉-3-羧酸甲酯·HCl(130mg, 0.30mmol),真空干燥30min,并用热风枪短暂加热至约150°C。将反应混合物在60°C加热2hr,得到粘稠的白色溶液。将该溶液置于冰浴中,并在烧结玻璃上收集白色晶体。用冷H₂O(3mL)洗涤固体并在2天内真空干燥,得到固体(101mg, 88.1%产率;TLC R_f=0.42(10%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%NH₃);HPLC R_t=2.404min)。

合成例113:MN1409(EDC偶联)

将2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]咪啉-3-羧酸乙酯(181mg, 0.74mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐-HCl(EDC-HCl)(150mg, 0.78mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(10mg, 0.078mmol)、羟基苯并三唑(HOBT)(40mg, 0.26mmol)和反-4-(Boc-甲基氨基)环己烷羧酸(212mg, 0.78mmol)全部溶解在乙腈(975uL)、二甲基甲酰胺(DMF)(3.9mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(156uL, 0.94mmol)中。将反应物在RT下搅拌5天。用EtOAc(100mL)稀释反应混合物,用饱和NaCl(2x 50mL)、1M柠檬酸(3x 25mL)、饱和NaHCO₃(3x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:5个级分(200mL),由己烷、30%EtOAc的己烷溶液、37%EtOAc的己

烷溶液、40%EtOAc的己烷溶液和50%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(100mg,27.2%产率;TLC $R_f=0.18$ (40%EtOAc的己烷溶液);HPLC $R_t=4.680\text{min}$)。

合成例114:MN1410(EDC偶联)

将2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶-3-羧酸异丙酯(201mg,0.78mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl(EDC-HCl)(150mg,0.78mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(10mg,0.078mmol)、羟基苯并三唑(HOBT)(40mg,0.26mmol)和反-4-(Boc-甲基氨基甲基)环己烷羧酸(212mg,0.78mmol)全部溶解在乙腈(975 μL)、二甲基甲酰胺(DMF)(3.9mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(156 μL ,0.94mmol)中。将反应物在RT下搅拌5天。用EtOAc(100mL)稀释反应混合物,用饱和NaCl(2x 50mL)、1M柠檬酸(3x 25mL)、饱和NaHCO₃(3x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。用EtOAc(100mL)稀释反应混合物,用饱和NaCl(2x 50mL)、1M柠檬酸(3x 25mL)、饱和NaHCO₃(3x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:5个级分(200mL),由己烷、30%EtOAc的己烷溶液、37%EtOAc的己烷溶液、40%EtOAc的己烷溶液和50%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(125mg,31.3%产率;TLC $R_f=0.21$ (40%EtOAc的己烷溶液);HPLC $R_t=4.790\text{min}$)。

合成例115:MN1411(EDC偶联)

将(S)-N-甲基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶-3-甲酰胺(200mg,0.872mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(10.6mg,0.087mmol)、羟基苯并三唑(HOBT)(88mg,0.576mmol)和反-4-(Boc-甲基氨基甲基)环己烷羧酸(237mg,0.872mmol)全部溶解在乙腈(1.1mL)、二甲基甲酰胺(DMF)(8mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(396 μL ,2.4mmol)中。将反应物在RT下搅拌2天,然后在60℃下搅拌6hr。用EtOAc(100mL)稀释反应混合物,用饱和NaCl(2x 50mL)、1M柠檬酸(3x 25mL)、饱和NaHCO₃(3x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。用己烷(20mL)研磨所得物,并用20%EtOAc的己烷溶液(20mL)洗脱。真空蒸发溶剂,得到固体(200mg,47.5%产率;TLC $R_f=0.32$ (5%MeOH的CH₂Cl₂溶液);HPLC $R_t=4.187\text{min}$)。

合成例116:MN1412(脲的形成)

将(1-异丁基-3,4-二氢-1H-吡啶基[3,4-b]吡啶-2(9H)-基)(反-4-((甲氨基)甲基)环己基)甲酮(114mg,0.30mmol)溶解于CHCl₃(7.5mL)中,并在冰浴中冷却5min。将异氰酸叔丁酯(68 μL ,0.60mmol)加入溶液中,并将反应混合物搅拌10min。从冰浴中移出反应物并温热至RT。浓缩混合物并在真空下干燥。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:4个级分(200mL),由己烷、40%EtOAc的己烷溶液、70%EtOAc的己烷溶液和80%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(50mg,34.7%产率;TLC $R_f=0.37$ (60%EtOAc的己烷溶液);HPLC $R_t=4.703\text{min}$)。

合成例117:MN1413(脲形成)

将(1-环丙基-3,4-二氢-1H-吡啶基[3,4-b]吡啶-2(9H)-基)(反-4-((甲氨基)甲基)环己基)甲酮(1.803g,5.1mmol)溶解于CHCl₃(50mL)中并在冰浴中冷却5min。将异氰酸叔丁酯(1.16mL,10.2mmol)加入溶液中,并将反应混合物搅拌20min。浓缩混合物并真空干燥,得到固体(2.6969g)。将该物质通过硅胶(160g)色谱法进一步纯化,使用:6个级分(1L),由己烷、

30%EtOAc的己烷溶液、40%EtOAc的己烷溶液、50%EtOAc的己烷溶液、60%EtOAc的己烷溶液和70%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到灰白色固体(2.0442mg,86.3%产率;TLC R_f =0.22(60%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t =4.410min);LCMS (ESI) m/z : [M+H]⁺Calcd for C₂₈H₄₀N₄O₂ 464.6428;Found 465.3244;¹H NMR (CDCl₃, 0.003% v/v TMS, 400MHz): δ H 0.40-0.50 (m, 1H), 0.57-0.80 (m, 3H), 1.00-1.15 (m, 2H), 1.20-1.27 (m, 1H), 1.35 (s, 9H), 1.50-1.70 (m, 3H), 1.75-1.85 (m, 3H), 1.95 (d, 1H), 2.56 (t, 1H), 2.85 (s, 4H), 3.13 (d, 2H), 3.56-3.70 (m, 1H), 4.10-4.23 (m, 2H), 5.20 (d, 1H), 7.01 (dd, 1H), 7.16 (dd, 1H), 7.33 (d, 1H), 7.46 (d, 1H), 8.02 (s, 1H)。

合成例118:MN1414(脲形成)

将(1-乙基-3,4-二氢-1H-吡啶基[3,4-b]吡啶-2(9H)-基)(反-4-((甲氨基)甲基)环己基)甲酮(73mg,0.20mmol)溶解于CHCl₃(5mL)中并在冰浴中冷却5min。将异氰酸叔丁酯(46 μ L,0.40mmol)加入溶液中,并将反应混合物搅拌10min。从冰浴中移出反应物并温热至RT。浓缩混合物并在真空下干燥。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:4个级分(200mL),由己烷、40%EtOAc的己烷溶液、70%EtOAc的己烷溶液和80%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(63mg,69.6%产率;TLC R_f =0.17(60%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t =4.414min)。

合成例119:MN1415(硫脲形成)

将(1-异丙基-3,4-二氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶-2(9H)-基)(反-4-((甲氨基)甲基)环己基)甲酮(92mg,0.25mmol)溶解于CHCl₃(6.25mL)中。将异硫氰酸叔丁酯(38.5 μ L,0.303mmol)搅拌过夜。在21hr,将聚合物结合的三(2-氨基)胺(188mg,0.75mmol)加入反应物中,以与过量的异硫氰酸酯反应。在22hr,通过0.45 μ m PTFE过滤器过滤反应物。真空蒸发溶剂,然后在高真空下干燥。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:4个级分(200mL),由己烷、40%EtOAc的己烷溶液、45%EtOAc的己烷溶液和50%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(101mg,83.7%产率;TLC R_f =0.17(50%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t =4.760min)。

合成例120:MN1416(Boc裂解)

将(反-4-(1-异丁基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶-2-羰基)环己基)甲基(甲基)氨基甲酸叔丁酯(330mg,0.685mmol)溶于CH₂Cl₂(10mL)和TFA(10mL)。将反应物搅拌10分钟,除去溶剂,并将所得物置于高真空下。将所得固体在搅拌下悬浮在H₂O(50mL)和CH₂Cl₂(50mL)中。加入10N NaOH直至溶液为碱性,并用CH₂Cl₂(3x 50mL)萃取产物,干燥(无水MgSO₄)并过滤。真空移除溶剂,得到固体(250mg,48.2%产率;TLC R_f =0.24(10%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%NH₃);HPLC R_t =3.689min)。

合成例121:MN1417(Boc裂解)

将(反-4-(1-乙基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶[3,4-b]吡啶-2-羰基)环己基)甲基(甲基)氨基甲酸叔丁酯(212mg,0.467mmol)溶于CH₂Cl₂(10mL)和TFA(10mL)。将反应物搅拌10分钟,除去溶剂,并将所得物置于高真空下。将所得固体在搅拌下悬浮在H₂O(50mL)和CH₂Cl₂(50mL)中。加入10N NaOH直至溶液为碱性,并用CH₂Cl₂(3x 50mL)萃取产物,干燥(无水MgSO₄)并过滤。真空移除溶剂,得到固体(146mg,88.4%产率;TLC R_f =0.19(10%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%NH₃);HPLC R_t =3.407min)。

合成例122:MN1418 (Boc热裂解)

将(反-4-(1-环丙基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶-2-羰基)环己基)甲基(甲基)氨基甲酸叔丁酯(308,0.66mmol)在铝块中净相(neat)加热至225℃保持38min。冷却到RT后,将所得油状物放置在真空下,得到粉末状浅棕色固体(225mg,93.3%产率;TLC R_f =0.21(10%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%NH₃);HPLC R_t =3.461min)。

合成例123:MN1421 (α -甲基色胺环化)

将(R)- α -甲基色胺(990mg,5.68mmol)溶解在1,1,1,3,3,3-六氟异丙醇(9.1mL)中。在28min内将2.0M多聚甲醛(2.85mL)的HFIP溶液滴加到溶液中。真空浓缩反应混合物并与CHCl₃(3x 100mL)共沸,得到固体(1.053g)。用ACN(6mL)研磨固体,过滤并真空干燥,得到固体(919mg,86.7%产率;TLC R_f =0.27(10%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%NH₃);HPLC R_t =2.660min)。

合成例124:MN1422 (EDC偶联)

将(R)-3-甲基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶(867.5mg,4.66mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl(EDC-HCl)(983mg,5.13mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(57mg,0.466mmol)、羟基苯并三唑(HOBT)(236mg,1.54mmol)和反-4-(Boc-甲基氨基)环己烷羧酸(1.264mg,4.66mmol)全部溶解在乙腈(5.8mL)、二甲基甲酰胺(DMF)(23mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(925 μ L,5.59mmol)中。将反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc(250mL)稀释反应混合物,用饱和NaCl(2x 50mL)、1M柠檬酸(3x 25mL)、饱和NaHCO₃(3x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发,得到固体(1.9213g,93.8%产率;TLC R_f =0.26(50%MeOH的己烷溶液);HPLC R_t =4.633min)。

合成例125:MN1423 (脲形成)

将((R)-3-甲基-3,4-二氢-1H-吡啶基[3,4-b]吡啶-2(9H)-基)(反-4-((甲氨基)甲基)环己基)甲酮(1.14g,3.36mmol)溶解于CHCl₃(50mL)中并放置在冰浴中。通过注射器将异氰酸叔丁酯(767 μ L,6.72mmol)加入溶液中。在20min时认定反应完成。真空浓缩反应混合物并真空干燥,得到固体(1.64g)。将该物质通过硅胶(160g)色谱法进一步纯化,使用:6个级分(200mL),由己烷、50%EtOAc的己烷溶液、60%EtOAc的己烷溶液、70%EtOAc的己烷溶液、80%EtOAc的己烷溶液和90%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(1.28g,87.0%产率;TLC R_f =0.20(70%EtOAc的己烷溶液);HPLC R_t =4.259min);LCMS (ESI) m/z : [M+H]⁺ Calcd for C₂₆H₃₈N₄O₂ 438.6055; Found 439.3105; ¹H NMR (CDCl₃, 0.003% v/v TMS, 400MHz): δ_H 1.00-1.30 (m, 5H), 1.35 (s, 9H), 1.45-1.55 (m, 3H), 1.55-1.70 (m, 3H), 1.75-1.90 (m, 4H), 2.50-2.63 (m, 1H), 2.65-2.77 (m, 1H), 2.82 (s, 3H), 3.00-3.10 (m, 1H), 3.12 (d, 2H), 4.00-4.20 (m, 2H), 4.55-4.65 (m, 1H), 5.40-5.50 (m, 2H), 7.07 (dd, 1H), 7.15 (dd, 1H), 7.31 (d, 1H), 7.44 (d, 1H), 7.93 (s, 1H)。

合成例126:中间体(酯形成)

在氩气惰性气氛下,使用冷凝器,将4-[(乙氨基)甲基]环己烷-1-羧酸盐(500mg, 2.26mmol)溶解在1.25M HCl的EtOH溶液(10mL, 12.5mmol)中,加热并在78℃下搅拌。然后将溶液回流48hr,得到固体。将固体溶于EtOH(10mL)中并旋转蒸发,得到白色固体。用EtOAc(100mL)溶解固体并用1M K₂CO₃(2x 10mL)、饱和NaCl(10mL)洗涤,真空蒸发,得到油状物(564mg,99%产率;HPLC(200nm) R_t =2.540min)。

合成例127:中间体(脲形成)

将4-((乙氨基)甲基)环己烷羧酸乙酯(564mg, 2.26mmol)溶解于CHCl₃(20mL)中并在冰浴中冷却。将异氰酸叔丁酯(387μL, 3.39mmol)添加到溶液中,并在2min内将三乙胺(TEA)逐滴添加到溶液中。将反应混合物从冰浴中移出,在RT下搅拌45min。旋转蒸发反应混合物,并在高真空下干燥。将所得物溶解在EtOAc(100mL)中,并用1M柠檬酸(3x 25mL)、1M NaCO₃(3x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。用Na₂SO₄干燥所得物,过滤,旋转蒸发,得到油状物。高真空下干燥油状物,结晶并得到固体(677mg, 96.0%产率;HPLC-ELSD R_t=4.306min)。

合成例128:中间体(酯水解)

将4-((3-叔丁基-1-乙基脲基)甲基)环己烷羧酸乙酯(677mg, 2.17mmol)溶解于1N NaOH(10mL, 10mmol)中并加热至90℃,同时在氩气惰性气氛下搅拌。2hr后,将10M NaOH(3mL, 30mmol)和EtOH(3mL)添加至反应混合物。将混合物在80℃加热1hr,然后允许其冷却至RT。旋转蒸发该溶液,并将所得物溶于H₂O(6mL)中,并用冷浓H₂SO₄酸化至pH为2。用EtOAc(3x 200mL)和1N HCl(2x 20mL)萃取产物。用35mL饱和NaCl+1N HCl洗涤有机层并用Na₂SO₄干燥。在高真空下蒸发溶剂,得到固体(370mg, 60%产率;HPLC(200nm)[顺式/反式(1:2)]R_t=3.563, 3.475min)。

合成例129:MN1424(EDC偶联)

将6,7,8,9-四氢-5H-吡啶并[2,3-b:5,4-c']二吡啶(250mg, 1.44mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl(EDC-HCl)(331mg, 1.73mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(18mg, 0.144mmol)、羟基苯并三唑(HOBT)(74mg, 0.48mmol)和反-4-(Boc-甲基氨基)甲基)环己烷羧酸(392mg, 1.44mmol)全部溶解在乙腈(1.8mL)、二甲基甲酰胺(DMF)(7.2mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(357μL, 2.16mmol)中。将反应物在RT下搅拌20小时。用EtOAc(100mL)稀释反应混合物,用以下洗涤:饱和NaCl(2x 50mL), 0.2M 2-(N-吗啉代)乙磺酸(MES)、pH 7缓冲液(2x 25mL), 饱和NaHCO₃(3x 25mL)和饱和NaCl(50mL)。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发,得到固体(408mg)。将产物溶解在EtOAc(20mL)中,并用1M柠檬酸(3x 50mL)并用EtOAc(10mL)洗涤。将10M NaOH添加到溶液中直至pH为7.8。用EtOAc(3x 100mL)萃取产物,干燥(无水Na₂SO₄),过滤,并在通风橱下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:6个级分(200mL),由CH₂Cl₂、2%MeOH的CH₂Cl₂溶液、4%MeOH的CH₂Cl₂溶液、6%MeOH的CH₂Cl₂溶液、8%MeOH的CH₂Cl₂溶液和10%MeOH的CH₂Cl₂溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(217mg, 35.3%产率;TLC R_f=0.19(4%MeOH的CH₂Cl₂溶液);HPLC R_t=3.579min)。

合成例130:MN1425(EDC偶联)

将1-乙基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶(100mg, 0.50mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl(EDC-HCl)(105mg, 0.55mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(6mg, 0.05mmol)、羟基苯并三唑(HOBT)(25mg, 0.165mmol)和反-4-(3-叔丁基-1-乙基脲基)甲基)环己烷羧酸(136mg, 0.50mmol)全部溶解在乙腈(625μL)、二甲基甲酰胺(DMF)(2.5mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(100μL, 0.60mmol)中。将反应物在RT下搅拌48小时。用EtOAc(100mL)稀释反应混合物,用饱和NaCl(2x 50mL)、1M柠檬酸(3x 25mL)、饱和NaHCO₃(3x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发,将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:5个级分(200mL),由己烷、40%EtOAc的己烷溶液、50%EtOAc

的己烷溶液和60%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(73mg)。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:5个级分(200mL),由CH₂Cl₂、12%EtOAc的CH₂Cl₂溶液、22%EtOAc的CH₂Cl₂溶液、25%EtOAc的CH₂Cl₂溶液和35%EtOAc的CH₂Cl₂溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(81mg,34.7%产率;TLC R_f=0.30(60%EtOAc的己烷溶液);HPLC[顺/反(1:4)]R_t=4.648,4.514min)。

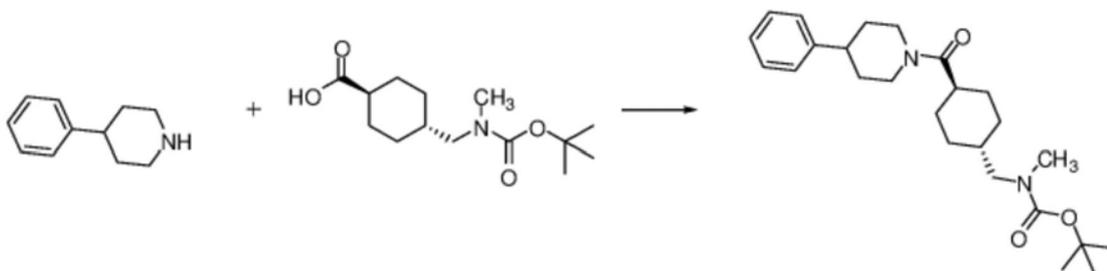
合成例131:MN1426(EDC偶联)

将1-环丙基-2,3,4,9-四氢-1H-吡啶并[3,4-b]吡啶(106mg,0.50mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl(EDC-HCl)(105mg,0.55mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(6mg,0.05mmol)、羟基苯并三唑(HOBT)(25mg,0.165mmol)和反-4-((3-叔丁基-1-乙基脲基)甲基)环己烷羧酸(136mg,0.50mmol)全部溶解在乙腈(625μL)、二甲基甲酰胺(DMF)(2.5mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(100μL,0.60mmol)中。将反应物在RT下搅拌48小时。用EtOAc(100mL)稀释反应混合物,用饱和NaCl(2x 50mL)、1M柠檬酸(3x 25mL)、饱和NaHCO₃(3x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:4个级分(200mL),由己烷、40%EtOAc的己烷溶液、50%EtOAc的己烷溶液和60%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(142mg)。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:5个级分(200mL),由CH₂Cl₂、10%EtOAc的CH₂Cl₂溶液、20%EtOAc的CH₂Cl₂溶液、25%EtOAc的CH₂Cl₂溶液和35%EtOAc的CH₂Cl₂溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(85mg,35.5%产率;TLC R_f=0.37(60%EtOAc的己烷溶液);HPLC[顺/反(1:4)]R_t=4.687,4.554min)。

合成例132:MN1443(脲形成)

将氮杂咪啉中间体(114mg,0.26mmol)溶于CHCl₃(20mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(100μL,0.60mmol)。经由注射器将异氰酸叔丁酯(32μL,0.286mmol)添加至溶液。将反应物在RT下搅拌45min。旋转蒸发反应混合物,并在高真空下干燥。将所得物通过硅胶(25-30g)色谱法纯化,使用:4个级分(200mL),由CH₂Cl₂、2%EtOAc的CH₂Cl₂溶液、5%EtOAc的CH₂Cl₂溶液和8%EtOAc的CH₂Cl₂溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂。然后将产物溶于EtOAc(100mL)中,并用以下洗涤:1M NaOH(3x 20mL),pH 7.0、0.2M MES缓冲液(3x 20mL),1MNaOH(1x 20mL)和盐水(1x 25mL)。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发,得到固体(70mg,63.3%产率;TLC R_f=0.15(5%MeOH的CH₂Cl₂溶液);HPLC R_t=3.212min)。

例:EDC偶联,与柠檬酸、NaHCO₃处理-MN1420-EDC偶联

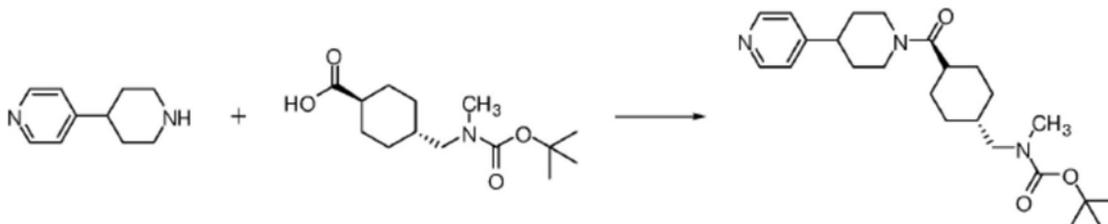


将4-苯基哌啶(161mg,1.00mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl(EDC-HCl)(192mg,1.00mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(12mg,0.1mmol)、羟基苯并三唑(HOBT)(51mg,0.33mmol)和反-4-(Boc-甲基氨基甲基)环己烷羧酸(271mg,1.00mmol)全部溶解在乙腈(1.25mL)、二甲基甲酰胺(DMF)(5mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(200μL,1.20mmol)中。将

反应物在RT下搅拌17小时。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物,用饱和NaCl (2x 50mL)、1M柠檬酸 (3x 25mL)、饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL) 洗涤。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层,过滤,并在真空下蒸发,将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化,使用:4个级分 (200mL),由己烷、25%EtOAc的己烷溶液、30%EtOAc的己烷溶液和35%EtOAc的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体 (330mg, 79.6%产率; TLC R_f=0.39 (50%EtOAc的己烷溶液); HPLC R_t=4.702min)。

MN1429、MN1430、MN1431、MN1432、MN1434、MN1449、MN1450、MN1451、MN1452、MN1453和MN1454的制备与MN1420类似。

例:EDC偶联,与MES缓冲液、NaHCO₃处理:MN1428-EDC偶联



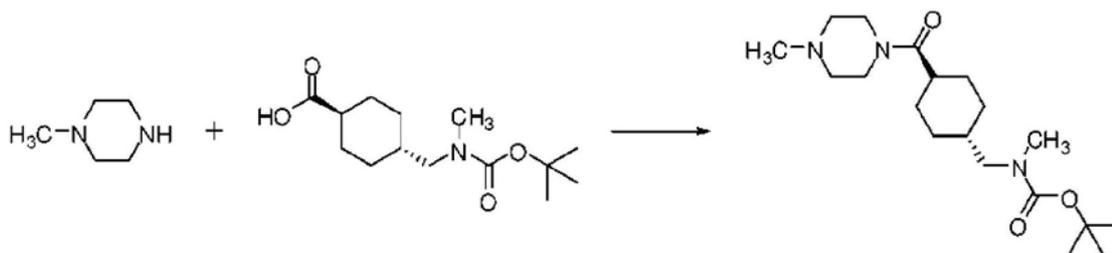
将4-(4-吡啶基)哌啶 (65mg, 0.40mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl) (84mg, 0.44mmol)、4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (5mg, 0.04mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (20mg, 0.132mmol) 和反-4-(Boc-甲基氨基甲基)环己烷羧酸 (82mg, 0.30mmol) 全部溶解在乙腈 (500mL)、二甲基甲酰胺 (DMF) (2mL) 和二异丙基乙胺 (DIEA) (79μL, 0.48mmol) 中。将反应物在RT下搅拌17hr。用EtOAc (100mL) 稀释反应混合物,用以下洗涤:饱和NaCl (2x 50mL)、0.1M MES、pH 7缓冲液 (3x 25mL),饱和NaHCO₃ (3x 25mL) 和饱和NaCl (50mL)。干燥 (无水Na₂SO₄) 有机层,过滤,并在真空下蒸发,将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化,使用:4个级分 (200mL),由CH₂Cl₂、2%MeOH的CH₂Cl₂溶液、4%MeOH的CH₂Cl₂溶液和5%MeOH的CH₂Cl₂溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体 (124mg, 99.5%产率; TLC R_f=0.22 (4%MeOH的CH₂Cl₂溶液); HPLC R_t=3.409min)。

MN 1427、MN 1447和MN1448的制备与MN1428类似。

合成例:MN1428T (甲苯磺酰基)

将甲基 ((4-(4-(吡啶-4-基)哌啶-1-羰基)环己基)甲基)氨基甲酸叔丁酯 (3.3066g, 7.9568mmol) 溶解在乙醚 (250mL) 中,然后通过0.45μm PTFE注射器过滤器过滤。将该溶液与溶于乙醚 (150mL) 中的对甲苯磺酸 (1.5144g, 7.956mmol) 合并,得到沉淀。浓缩混合物并在真空下干燥。将所得物从沸腾的乙腈 (10mL) 中重结晶,快速冷却,并在漏斗上收集所得固体。然后将其从沸腾的乙腈 (20mL) 中再次重结晶,在3天内缓慢冷却至RT,并倾析出母液。在RT下用乙腈 (5mL) 冲洗固体,在漏斗上收集,并在真空干燥器中干燥16hr,得到白色固体 (2.08g, 44.5%产率; HPLC R_t=3.329min)。

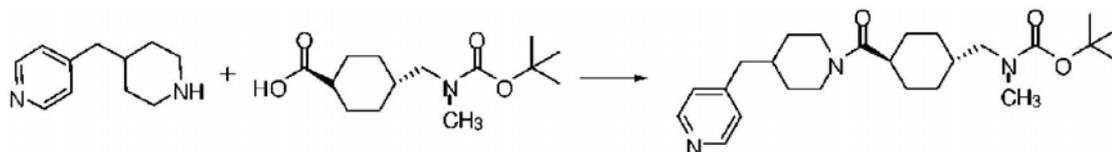
DCC偶联与K₂CO₃处理例:MN1433-EDC偶联



合成例MN1433 (DCC偶联)

将1-甲基哌嗪 (100mg, 1.00mmol)、 N,N' -二环己基碳二亚胺 (227mg, 1.10mmol)、1-羟基苯并三唑 (51mg, 0.33mmol) 和反-4-(Boc-甲基氨基甲基)环己烷羧酸 (271mg, 1.00mmol) 全部溶解在乙腈 (10.0mL) 中。将反应物在RT下搅拌16小时。除去所得沉淀, 在漏斗上收集, 并在真空下蒸发滤液。将来自滤液的所得油状物溶于EtOAc (5mL) 中, 并通过0.22 μ m PTFE注射器式过滤器过滤, 然后用EtOAc (95mL) 稀释。用1M K_2CO_3 (3x 33mL) 和盐水 (1x 50mL) 洗涤该溶液。干燥 (无水 Na_2SO_4) 有机层, 过滤, 并在真空下蒸发, 将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 5个级分 (200mL), 由 CH_2Cl_2 +1% NH_3 、1%MeOH的 CH_2Cl_2 溶液+1% NH_3 、2%MeOH的 CH_2Cl_2 溶液+1% NH_3 、5%MeOH的 CH_2Cl_2 溶液+1% NH_3 和10%MeOH的 CH_2Cl_2 溶液+1% NH_3 组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到油状物 (319mg, 90.2%产率; TLC R_f =0.16 (4%MeOH的 CH_2Cl_2 溶液+1% NH_3); HPLC R_t =3.133min)。以类似方式合成以下化合物: MN1433、MN1437、MN1438、MN1455、MN1456、MN1457、MN1458、MN1459、MN1460。

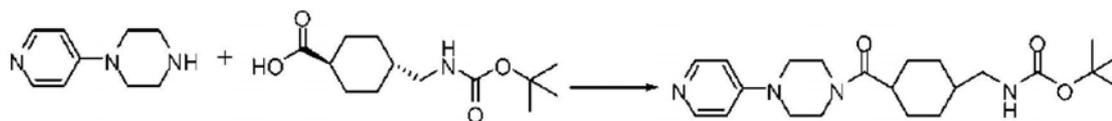
DCC偶联与NaOH/MOPS/HCl处理例: MN1456-DCC偶联



将4-(哌啶-4-基甲基)吡啶 (88mg, 0.5mmol) 和反-4-(Boc-甲基氨基甲基)环己烷羧酸 (136mg, 0.5mmol) 均溶解在乙腈 (5mL) 中, 然后加入 N,N' -二环己基碳二亚胺 (DCC) (113mg, 0.55mmol) 之前。在24小时, 通过烧结玻璃过滤反应物, 并在真空下除去溶剂, 得到固体。将所得固体溶解在EtOAc (100mL) 中, 并用1N NaOH (3x 25mL) 和pH 8 0.2M MOPS缓冲液 (3x 20mL) 洗涤。用0.1N HCl (3x 50mL) 萃取产物, 用10N NaOH (5mL) 碱化, 用 CH_2Cl_2 (3x 50mL) 萃取, 并用盐水 (30mL) 洗涤。干燥 (无水 $MgSO_4$) 有机层, 过滤, 真空下蒸发溶剂, 并在真空下干燥所得固体。将该物质通过硅胶 (25-30g) 色谱法进一步纯化, 使用: 4个级分 (200mL), 由己烷、35%丙酮的己烷溶液、50%丙酮的己烷溶液和65%丙酮的己烷溶液组成。合并含有产物的级分, 并真空蒸发溶剂, 得到固体 (46mg, 21%产率; TLC R_f =0.29 (5%MeOH的 CH_2Cl_2 溶液); HPLC-200nm R_t =3.401min)。

MN1456、MN1457、MN1458、MN1459和MN1460的制备与MN1455类似。

DCC偶联, 与NaOH/盐水处理例: MN1435-EDC偶联

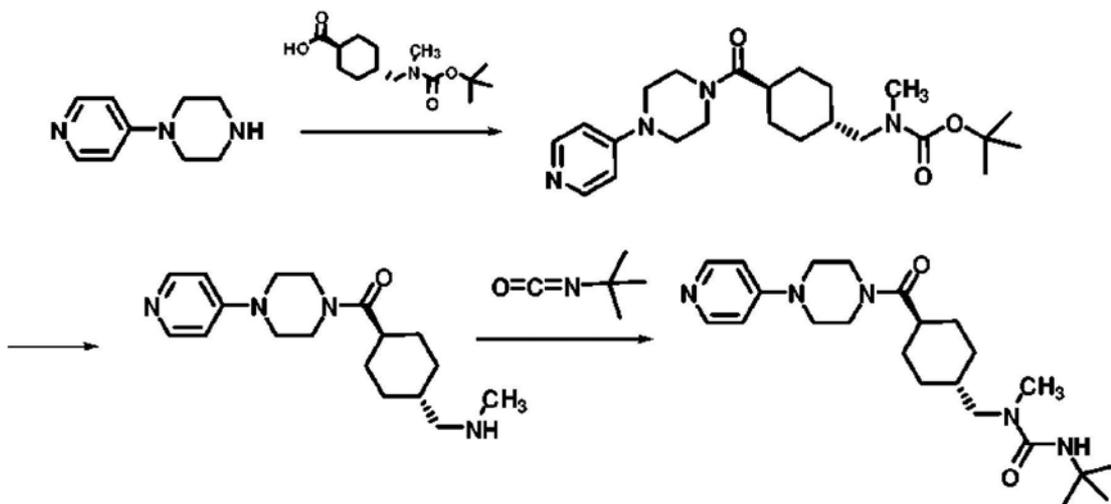


将1-(4-吡啶)哌嗪 (326mg, 2.00mmol)、羟基苯并三唑 (HOBT) (101mg, 0.66mmol)、 N,N' -二环己基碳二亚胺 (DCC) (454mg, 2.2mmol) 和Boc-反-4-(氨基甲基)环己烷-1-羧酸 (515mg,

2.00mmol) 全部溶解在乙腈(100mL)中。将反应物在RT下搅拌72hr。过滤反应混合物并真空蒸发滤液。将所得物溶于EtOAc(8mL)中并使用注射器通过0.22um PTFE过滤器过滤。用EtOAc(100mL)稀释滤液并用1M NaOH(3x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:3个级分(200mL),由CH₂Cl₂+1%NH₃、5%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%NH₃、12%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%NH₃和20%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%NH₃组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(755.5mg,93.8%产率;TLC R_f=0.33(10%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%NH₃);HPLC-200nm R_t=3.137min)。

MN1436、MN1437和MN1438的合成类似于MN1435。

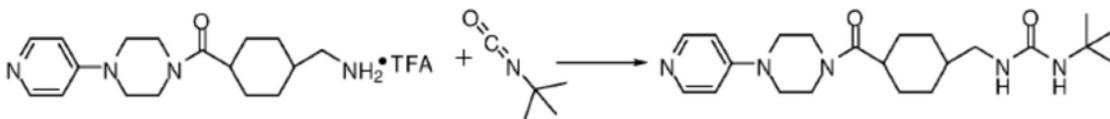
叔丁基脲同类物的合成例:MN1439-偶联、Boc裂解、脲形成方案。



MN1435 Boc裂解

将甲基((1s,4s)-4-(4-(吡啶-4-基)哌嗪-1-羰基)环己基)甲基氨基甲酸叔丁酯(652.8mg,1.62mmol)溶于CH₂Cl₂(7mL),然后加入三氟乙酸(7mL)。将反应物搅拌20min,然后用甲苯(100mL)稀释并蒸发。将所得剩余物溶于1,4-二恶烷(25mL)中并在真空下蒸发。将其真空干燥,得到固体(1.401g,201%产率[剩余TFA];TLC R_f=0.24(10%MeOH的CH₂Cl₂溶液+1%NH₃);HPLC-200nm R_t=0.846min。

MN1439-脲形成

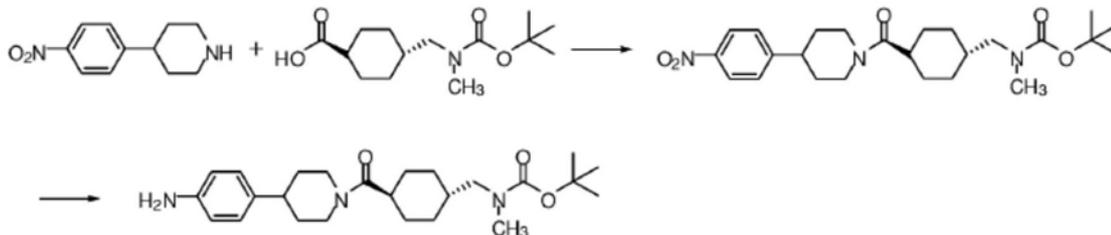


[0808] 将(4-(氨基甲基)环己基)(4-(吡啶-4-基)哌嗪-1-基)甲酮X-TFA络合物(1.62mmol)悬浮在CHCl₃(50mL)中,然后通过注射器添加异氰酸叔丁酯(457uL,4mmol)和N,N-二异丙基乙胺(2.4mL,13.78mmol)。将反应物在RT下搅拌16hr。将反应混合物在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法纯化,使用:3个级分(200mL),由CH₂Cl₂+1%NH₃、具有1%NH₃的5%MeOH的CH₂Cl₂溶液、具有1%NH₃的10%MeOH的CH₂Cl₂溶液和具有1%NH₃的15%MeOH的CH₂Cl₂溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(469mg)。该物质被TFA-DIEA污染,并通过溶解在EtOAc中进一步纯化,然后用1N NaOH(3x 25mL)和盐水(25mL)洗涤,Na₂SO₄干燥,蒸发,得到292mg(45%产率);TLC R_f=0.24(10%MeOH的CH₂Cl₂溶

液的+1%NH₃);HPLC-200nm R_t=2.887min)。

MN1440、MN1441、MN1442、MN1444和MN1445的制备与MN1439类似。

MN1461-EDC偶联-硝基还原



将4-(4-硝基苯基)哌啶(206mg,1mmol)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺-HCl (EDC-HCl)(211mg,1.10mmol)、4-二甲氨基吡啶(DMAP)(12mg,0.10mmol)、羟基苯并三唑(HOBT)(51mg,0.33mmol)和反-4-(Boc-甲基氨基甲基)环己烷羧酸(271mg,1.00mmol)溶解在乙腈(1.25mL)、二甲基甲酰胺(DMF)(5mL)和二异丙基乙胺(DIEA)(200uL,1.2mmol)中。将反应物在RT下搅拌17hr。然后用EtOAc(100mL)稀释反应混合物,用饱和NaCl(2x 50mL)、1M柠檬酸(3x25mL)、饱和NaHCO₃(3x 25mL)和饱和NaCl(50mL)洗涤。干燥(无水Na₂SO₄)有机层,过滤,并在真空下蒸发。将该物质通过硅胶(25-30g)色谱法进一步纯化,使用:4个级分(200mL),由己烷、20%丙酮的己烷溶液、30%丙酮的己烷溶液和40%丙酮的己烷溶液组成。合并含有产物的级分,并真空蒸发溶剂,得到固体(274.6mg,60%产率;TLC R_f=0.31(5% MeOH的CH₂Cl₂溶液);HPLC(200nm)R_t=3.263min)。

将甲基((1s,4s)-4-(4-(4-硝基苯基)环己烷羧基)环己基)甲基氨基甲酸叔丁酯(147mg,0.32mmol)溶解在甲醇(5mL)中,然后添加碳载钯(37mg)。使用气球将反应物氢化2小时,然后在Ar惰性气氛中抽空氢气。通过celite过滤反应混合物,然后真空蒸发滤液,得到固体(120mg,87%产率;TLC R_f=0.31(5% MeOH的CH₂Cl₂溶液);HPLC(200nm)R_t=3.263min)。

表1物理数据和合成方法表

化合物	HPLC Rt (min)	TLC Rf	TLC 洗脱液	环化方法	酰胺形成方法
MN1292	4.683	0.14	30% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1293	4.885	0.21	30% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1294	5.271	0.12	10% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1305	4.386	0.59	50% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1306	4.504	0.24	50% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1307	4.712	0.36	50% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1308	4.743	0.10	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1309	3.909 & 3.955	0.05	5% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液 + 1% NH ₄ OH	A	F
MN1310	5.269	0.20	20% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1311	5.107	0.34	30% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1312	4.149	0.05	4% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液	A	F
MN1317	4.713	0.12	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1318	4.870	0.17	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1319	4.984	0.13	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1320	4.771	0.10	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1321	5.096	0.15	25% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1322	4.739	0.19	30% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1329	4.304	0.59	5% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液 + 1% HOAc	A	F
MN1330	5.031	0.33	40% EtOAc 的己烷溶液	A	F

MN1331	4.986	0.15	30% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1332	5.231	0.22	30% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1333	5.238	0.32	30% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1334	5.081	0.35	40% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1335	5.282	0.30	30% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1336	5.278	0.20	30% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1337	5.124	0.28	30% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1338	5.106	0.42	40% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1339	4.966	0.32	40% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1340	4.947	0.28	40% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1341	4.928	0.12	30% EtOAc 的己烷溶液	商业	F
MN1351	4.294	0.39 & 0.43	50% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1352	4.851	0.27	40% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1353	5.002	0.32	40% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1355	4.812	0.21	40% EtOAc 的己烷溶液	H2SO4	F
MN1356	5.247	0.22	30% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1357	5.197	0.22	30% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1358	5.312	0.31	30% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1359	5.321	0.32	30% EtOAc 的己烷溶液	C	F
MN1360	5.327	0.19	30% EtOAc 的己烷溶液	C	F
MN1362	4.507	0.14	40% EtOAc 的己烷溶液	商业	F
MN1363	4.846	0.20	40% EtOAc 的己烷溶液	商业	F
MN1369	4.910	0.29	40% EtOAc 的己烷溶液	商业酯	TFFH
MN1370	4.373	0.17	2% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液 + 1% HOAc	酯水解多步	
MN1371	4.506	0.36	2% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液 + 1% HOAc	酯水解多步	
MN1372	4.216	0.15	2% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液 + 1% HOAc	酯水解多步	
MN1377	5.103	0.29	40% EtOAc 的己烷溶液	TFA	F
MN1378	4.978	0.18	40% EtOAc 的己烷溶液	H2SO4	F
MN1379	5.008	0.23	40% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1380	5.034	0.25	40% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1381	4.913	0.21	40% EtOAc 的己烷溶液	TFA	F

MN1382	4.939	0.26	40% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1383	4.993	0.28	40% EtOAc 的己烷溶液	TFA	F
MN1384	4.877	0.19	40% EtOAc 的己烷溶液	TFA	F
MN1385	4.909	0.26	40% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1386	4.769	0.43	50% EtOAc 的己烷溶液	与氯甲酸酯的多步反应	
MN1387	4.891	0.46	50% EtOAc 的己烷溶液	与氯甲酸酯的多步反应	
MN1388	4.292	0.14	70% EtOAc 的己烷溶液	与酰氯的多步反应	
MN1389	4.723	0.17	50% EtOAc 的己烷溶液	与酰氯的多步反应	
MN1390	4.569	0.15	60% EtOAc 的己烷溶液	与酰氯的多步反应	
MN1391	4.178	0.226	4% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液	与异氰酸酯的多步	
MN1392	4.524	0.14	50% EtOAc 的己烷溶液	与异氰酸酯的多步	
MN1393	4.484	0.13	50% EtOAc 的己烷溶液	与异氰酸酯的多步	
MN1394	4.672	0.31	50% EtOAc 的己烷溶液	商业	F
MN1395	4.555	0.23	50% EtOAc 的己烷溶液	商业	F
MN1396	3.735	0.26	5% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液 + 1% NH ₃	多步还原胺化	
MN1397	4.044	0.15	5% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液	多步还原胺化	
MN1398	3.972	0.46	10% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液	多步还原胺化	
MN1399	3.929	0.26	5% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液 + 1% NH ₃	多步还原胺化	
MN1401	4.089	0.15	4% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液	酯的 La(TfI) ₃ 胺	F
MN1402	4.919	0.24	40% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1403	4.674	0.3	50% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1409	4.68	0.18	40% EtOAc 的己烷溶液	多步酯形成	F
MN1410	4.79	0.21	40% EtOAc 的己烷溶液	多步酯形成	F
MN1411	4.187	0.32	5% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液	酯的酰胺化	F
MN1412	4.703	0.37	60% EtOAc 的己烷溶液	与异氰酸酯的多步	
MN1413	4.410	0.22	60% EtOAc 的己烷溶液	与异氰酸酯的多步	
MN1414	4.414	0.17	60% EtOAc 的己烷溶液	与异氰酸酯的多步	
MN1415	4.76	0.28	50% EtOAc 的己烷溶液	与异硫氰酸酯的多步	
MN1419	4.416	0.28	60% EtOAc 的己烷溶液	商业	F

MN1420	4.702	0.39	50% EtOAc 的己烷溶液	商业	F
MN1422	4.633	0.26	50% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1423	4.259	0.2	70% EtOAc 的己烷溶液	与异氰酸酯的多步	
MN1424	3.579	0.19	4% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液	商业	F
MN1425	4.514	0.3	60% EtOAc 的己烷溶液	H ₂ SO ₄	F
MN1426	4.554	0.37	60% EtOAc 的己烷溶液	A	F
MN1427	4.086	0.17	40% EtOAc 的己烷溶液	商业	F
MN1428	3.409	0.22	4% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液	商业	F
MN1429	3.746	0.23	60% EtOAc 的己烷溶液	商业	F
MN1430	4.231	0.23	40% EtOAc 的己烷溶液	商业	F
MN1431	4.496	0.28	40% EtOAc 的己烷溶液	商业	F
MN1432	4.774	0.4	40% EtOAc 的己烷溶液	商业	F
MN1433	3.133	0.16	4% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液 + 1% NH ₃	商业	DCC
MN1434	4.602	0.26	60% EtOAc 的己烷溶液	商业	F
MN1435	3.137	0.33	10% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液 + 1% NH ₃	商业	F
MN1436	3.378	0.36	10% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液 + 1% NH ₃	商业	F
MN1437	3.36	0.2	2% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液 + 1% NH ₃	商业	DCC
MN1438	3.373	0.14	4% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液 + 1% NH ₃	商业	DCC
MN1439	2.887	0.24	10% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液 + 1% NH ₃	与异氰酸酯的多步	
MN1440	3.067	0.34	10% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液 + 1% NH ₃	与异氰酸酯的多步	
MN1441	3.639	0.2	2% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液 + 1% NH ₃	与异氰酸酯的多步	
MN1442	3.068	0.26	5% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液 + 1% NH ₃	与异氰酸酯的多步	
MN1443	3.212	0.15	5% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液	与异氰酸酯的多步	
MN1444	3.044	0.17	3% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液 + 1% NH ₃	与异氰酸酯的多步	
MN1445	3.066	0.11	3% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液 + 1% NH ₃	与异氰酸酯的多步	
MN1447	3.333	0.18	3% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液	商业	F
MN1448	3.354	0.29	5% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液	商业	F

MN1449	3.843	0.28	5% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液	商业	F
MN1450	3.917	0.26	5% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液	商业	F
MN1451	4.824	0.41	5% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液	商业	F
MN1452	4.030	0.34	5% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液	商业	F
MN1453	4.957	0.33	50% EtOAc 的己烷溶液	商业	F
MN1454	4.876	0.35	50% EtOAc 的己烷溶液	商业	F
MN1455	3.382	0.42	10% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液	商业	DCC
MN1456	3.401	0.29	5% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液	商业	DCC
MN1457	3.242	0.28	5% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液	商业	DCC
MN1458	3.258	0.74	20% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液	商业	DCC
MN1459	3.306	0.67	20% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液	商业	DCC
MN1460	3.263	0.31	5% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液	商业	DCC
MN1461	3.499	0.32	5% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液	多步硝基还原	
MN1462	3.392	0.31	60%丙酮的己烷溶液	商业	F
MN1463	3.416	0.49	60%丙酮的己烷溶液	商业	F
MN1464	3.289	0.29	60%丙酮的己烷溶液	商业	F
MN1465	3.36	0.4	60%丙酮的己烷溶液	商业	F
MN1466	3.268	0.29	60%丙酮的己烷溶液	商业	F
MN1467	3.204	0.3	60%丙酮的己烷溶液	商业	F
MN1468	3.207	0.29	60%丙酮的己烷溶液	商业	F
MN1469	3.208	0.26	5% MeOH 的 CH ₂ Cl ₂ 溶液	商业	F
MN1470	4.668	0.84	60%丙酮的己烷溶液	商业	F
MN1471	5.044	0.29	40% EtOAc 的己烷溶液	商业	F

化合物的生物活性的概述。

图18A-18E示出了构效关系图。在伤口愈合测定中进行了癌细胞迁移的百分比抑制。与对照相比,在存在候选药物的情况下,侵袭性癌细胞占据的面积百分比通过ImageJ细胞软件量化,该软件能够从照片中进行细胞计数。通过在几种化合物浓度下进行迁移实验,然后应用HilFs方程来计算IC₅₀。通过在存在或不存在候选药物的情况下进行自动细胞计数来量化癌细胞增殖的抑制作用。量化数据示于图18A-18E。在此,如果对癌细胞增殖的抑制为25%,则对癌细胞增殖的抑制得分为1;如果抑制为50%,则得分为2;如果抑制为75%,则得分为3,以及4是最高程度的抑制得分,和0是最低的抑制得分。根据细胞形态和细胞密度,用肉眼对候选药物对干细胞多能性或增殖的影响进行评分,其中0表示形态或细胞数量无变化,4表示最深远的影响,其中干细胞呈现分化细胞的形态,伴随更少的细胞表明增殖抑制。例如,图30A-30F显示了幼稚干细胞、始发干细胞和成纤维细胞对照的照片。图31A-31F显示了本发明的化合物对幼稚状态干细胞的影响,其中符号‘+’的数目表示化合物抑制幼稚干细胞多能性、增殖或诱导其分化能力的0-4分。图31G-31L显示了对更成熟的始发状态干细

胞的影响的相对缺乏,和图31M-31R显示了这些化合物对是正常、健康细胞的替代物的成纤维细胞没有影响。图36-44和65-87显示了本发明化合物抑制癌细胞迁移和侵袭的照片和IC50图。癌细胞迁移是转移性癌症的标志。

在此,我们描述了鉴定抑制肿瘤侵袭、迁移和转移的药剂的方法,该方法包括以下步骤:

- 1) 在化合物存在下培养幼稚干细胞和成纤维细胞;
- 2) 观察到化合物抑制幼稚干细胞的生长和/或多能性;
- 3) 观察到所述化合物对成纤维细胞几乎没有或没有影响;和
- 4) 得出结论,所述化合物将抑制癌细胞的生长或侵袭性。

总之,对幼稚干细胞有最大影响的化合物是癌细胞迁移和侵袭的有效抑制剂,因为它们抑制幼稚干细胞的多能性和/或生长,但对始发状态干细胞或成纤维细胞的影响几乎没有或没有影响。在某些情况下,这些化合物还抑制癌细胞的生长。因为本发明的化合物是癌细胞迁移(也称为侵袭)的有效抑制剂,所以这些化合物可用于治疗或预防癌症转移。

发明人假设在始发状态干细胞中而非在幼稚状态干细胞中被超级增强子占据的基因是分化的主要调节因子。的确,调节基本的螺旋-环-螺旋转录因子的HES3和介导许多对分化至关重要的因子的活性的GNAS,以及在始发状态干细胞中上调而在幼稚状态干细胞中却没有的其他超增强基因靶标,被本发明的化合物上调(图89A-89H)。β-连环蛋白和MUC1的升高与癌症的迁移、侵袭和转移有关(Sachdev and Mo,CancerRes:70(1);378-87,2010)。本发明的化合物引起活性β-连环蛋白的量减少(图89A;图90A)和MUC1*配体NME7_{AB}和NME7-X1的表达减少(图90B,90C)。由于在技术上很难测量活化的核β-连环蛋白,因此通常要代替测量AXIN2,其表达直接由活化的核β-连环蛋白驱动。MicroRNA-145已鉴定为干细胞分化的预兆(Xu,N et al,MicroRNA-145Regulates OCT4,SOX2,and KLF4 and Represses Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells.Cell.137(4),p647-658,15May 2009.D01:10.1016/j.cell.2009.02.038;Smagge et al,"MUC1*Ligand,NM23-H1,is a Novel Growth Factor that Maintains Human Stem Cells in a More Naive State/5PLoS ONE2013)。Sachdeva和Mo报道了miR-145抑制肿瘤迁移和侵袭。在这里,我们报道了本发明的化合物增加了miR-145的表达(图91A-91C和图92A-92C)。

在本发明的一方面,将有效量的化合物MN1292-MN1471中的一种或多种给予诊断为患有癌症或有患癌症风险的患者。在本发明的另一方面,将有效量的式1-17的化合物中的一种或多种给予诊断为患有癌症或有患癌症风险的患者。一方面,将本发明的化合物给予患者以治疗或预防转移。在另一方面,将本发明的化合物给予患者以治疗特征为侵袭性的癌症。另一方面,将本发明的化合物给予诊断为2级或2期癌症的患者。在又一方面,将本发明的化合物给予诊断为得分为非零的T、N或M癌症的患者。在又一方面,将本发明的化合物给予诊断为患有MUC1阳性或MUC 1*阳性癌症的患者。在另一方面,将本发明的化合物给予诊断为患有NME7阳性、NME_{AB}阳性或NME7-X1阳性癌症的患者。

药物组合物

本发明的某些化合物包含不对称取代的碳原子。这样的不对称取代的碳原子可以致使本发明的化合物包含在特定的非对称取代的碳原子处的立体异构体的混合物或单一立体异构体。结果,本发明化合物的外消旋混合物、非对映异构体的混合物以及单一非对映异构

体都包括在本发明中。本文所用的术语“S”构型和“R”构型是由IUPAC 1974“RECOMMENDATIONS FOR SECTION E, FUNDAMENTAL STEREOCHEMISTRY,” Pure 172Appl. Chem. 45:13-30, 1976. 所定义。术语 α 和 β 用于环状化合物的环位置。参考平面的 α 侧是优选的取代基位于较低编号位置的那一侧。位于参考平面相反侧的那些取代基使用 β 描述符。应该注意的是, 这种用法不同于用于环状立体母核的用法, 其中“ α ”是指“在平面下方”和表示绝对构型。本文所用的术语 α 和 β 构型如“Chemical Abstracts Index Guide,” Appendix IV, paragraph 203, 1987. 中所定义。

如本文所用, 术语“药学上可接受的盐”是指本发明化合物的无毒的酸或碱土金属盐。这些盐可以分别在化合物的最后分离和纯化过程中原位制备, 或者通过使碱或酸官能团分别与合适的有机酸或无机酸或碱反应而制备。代表性的盐包括但不限于以下: 乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、柠檬酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、二葡萄糖酸盐、环戊烷丙酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、富马酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、烟酸盐、2-萘-磺酸盐、草酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯丙酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐和十一烷酸盐。同样, 碱性含氮基团可以用诸如烷基卤化物(如甲基、乙基、丙基和丁基氯、溴化物和碘化物); 硫酸二烷基酯(如二甲基, 二乙基, 二丁基和二戊基硫酸盐), 长链卤化物(如癸基, 月桂基, 肉豆蔻基和硬脂基氯化物, 溴化物和碘化物), 芳烷基卤化物(如苄基和苯乙基溴化物)等的药剂来季胺化。由此获得水溶性或油溶性或分散性产物。

可用于形成药学上可接受的酸加成盐的酸的实例包括无机酸如盐酸、硫酸和磷酸, 以及有机酸如草酸、马来酸、甲磺酸、琥珀酸和柠檬酸。碱性加成盐可以在本发明化合物的最后分离和纯化过程中原位制备, 也可以通过使羧酸部分分别与合适的碱(例如药学上可接受的金属阳离子的氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐)或与氨或有机伯、仲或叔胺反应而制备。药学上可接受的盐包括但不限于基于碱金属和碱土金属的阳离子, 例如钠、锂、钾、钙、镁、铝盐等, 以及无毒的铵、季铵和胺阳离子, 包括但不限于铵、四甲基铵、四乙铵、甲胺、二甲胺、三甲胺、三乙胺、乙胺等。可用于形成碱加成盐的其他代表性有机胺包括二乙胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪等。

如本文所用, 术语“药学上可接受的前药”是指本发明化合物的那些前药, 其在合理的医学判断范围内, 适用于与人和低等动物的组织接触而没有过度的毒性、刺激性、过敏反应等, 符合合理的获益/风险比, 并且对其预期用途和在可能的情况下的本发明化合物的两性离子型有效。术语“前药”是指化合物, 其例如在血液中通过水解在体内快速转化以产生上式的母体化合物。在Higuchi, T., and V. Stella, “Pro-drugs as Novel Delivery Systems,” A.C. Symposium Series 14中, 和在Higuchi, T., and V. Stella, “Pro-drugs as Novel Delivery Systems,” A.C.S. Symposium Series 14, and in “Bioreversible Carriers in Drug Design,” in Edward B. Roche (ed.), American Pharmaceutical Association, Pergamon Press, 1987中进行了详尽的讨论, 这两个文献均通过引用并入本文。

本发明的化合物在体外或体内可用于抑制癌细胞的生长。这些化合物可以单独使用, 也可以与药学上可接受的载体或赋形剂一起使用。合适的药学上可接受的载体或赋形剂包

括例如加工剂和药物递送改性剂和增强剂,如,例如磷酸钙、硬脂酸镁、滑石粉、单糖、二糖、淀粉、明胶、纤维素、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、右旋糖,羟丙基-β-环糊精、聚乙烯基-吡咯烷酮、低熔点蜡、离子交换树脂等,以及它们中任意两种或更多种的组合。其他合适的药理学上可接受的赋形剂在“Remington's Pharmaceutical Sciences”(Mack Pub.Co.,New Jersey,1991)中描述,通过引用并入本文。

本发明的化合物的有效量通常包括通过本文描述的任何测定法、通过本领域技术人员已知的其他MUC1*阳性活性测定法、或通过检测抑制或减轻癌症症状,足以能够检测到抑制MUC1*阳性活性的任何量。

可与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量,其将根据所治疗的宿主和特定的给药方式而变化。然而,应理解,任何特定患者的具体剂量水平将取决于多种因素,包括所用具体化合物活性、年龄、体重、总体健康、性别、饮食、给药时间、给药途径、排泄速率、药物组合以及接受治疗的特定疾病的严重程度。对于特定情况的治疗有效量可以通过常规实验容易地确定并在本领域临床医生的技能和判断内。

出于本发明的目的,治疗有效剂量通常是给予宿主的每日总剂量,可为单剂量或分剂量,其量可以为例如每日0.001至1000mg/kg体重,和更优选每日1.0至30mg/kg体重。剂量单位组合物可包含该剂量因数的量以组成每日剂量。

本发明的化合物可以按需要以含有常规无毒的药理学上可接受的载体、佐剂和载(vehicles)剂的剂量单位制剂经口、肠胃外、舌下、通过雾化或吸入喷雾、直肠或局部给药。局部给药也可涉及使用透皮给药,例如透皮贴剂或离子渗透装置。如本文所用的术语肠胃外包括皮下注射、静脉内、肌肉内、胸骨内注射或输注技术。

可根据已知技术使用合适的分散或湿润剂和悬浮剂(例如无菌可注射水性或油质悬浮液)来配制注射制剂,无菌可注射制剂也可以是在无毒的肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或混悬液,例如在1,3-丙二醇中的溶液。可以使用的可接受的载剂和溶剂是水、Ringer's溶液和等渗氯化钠溶液。另外,无菌的、不挥发性油通常用作溶剂或悬浮介质。为此,可以使用任何温和不挥发性油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。另外,发现脂肪酸如油酸可用于制备可注射剂中。

可以通过将药物与合适的无刺激性赋形剂(例如可可脂和聚乙二醇)混合来制备用于直肠给药的栓剂,它们在常温下为固体,但在直肠温度下为液体,因此会在直肠中融化并释放出药物。

用于口服的固体剂型可以包括胶囊剂、片剂、丸剂、散剂和颗粒剂。在这样的固体剂型中,可以将活性化合物与至少一种惰性稀释剂(例如蔗糖乳糖或淀粉)混合。这种剂型还可以按照惯例,将惰性稀释剂以外的其他物质包括在内,例如润滑剂、诸如硬脂酸镁。就胶囊、片剂和丸剂而言,剂型还可包含缓冲剂。片剂和丸剂还可以用肠溶衣制备。

用于口服的液体剂型可以包括药理学上可接受的乳剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂和酞剂,其含有本领域常用的惰性稀释剂(例如水)。这样的组合物还可包含佐剂,例如湿润剂、乳化剂和悬浮剂、环糊精和甜味剂、调味剂和加香剂。

本发明的化合物也可用脂质体的形式给药。如本领域中已知的,脂质体通常衍生自磷脂或其他脂质物质。脂质体是由分散在水性介质中的单层或多层水合液晶形成的。可以使用能够形成脂质体的任何无毒的、生理上可接受的和可代谢的脂质。本发明脂质体形式的

组合物除了本发明化合物外,还可包含稳定剂、防腐剂、赋形剂等。优选的脂质是天然和合成的磷脂和磷脂酰胆碱(卵磷脂)。形成脂质体的方法是本领域已知的。参见,例如,Prescott(ed.),Prescott(ed.),"Methods in Cell Biology,"Volume XIV,Academic Press,New York,1976,p.33et seq。

虽然本发明的化合物可以作为唯一的活性药物给药,但是它们也可以与一种或多种用于治疗癌症的其他药物组合使用。与本发明的化合物组合用于治疗癌症的有用的代表性药物包括,例如,伊立替康、托泊替康、吉西他滨、格列卫、赫赛汀、5-氟尿嘧啶、亚叶酸钙、卡铂、顺铂、紫杉烷、替扎他滨、环磷酰胺、长春花生物碱、伊马替尼、葱环类药物、利妥昔单抗、曲妥珠单抗、拓扑异构酶I抑制剂、以及其他癌症化学治疗剂。

将要与本发明的化合物组合使用的以上化合物将以Physicians1 Desk Reference (PDR) 47th Edition (1993) 中所示的治疗量使用,该文献以引用的方式并入本文中,或如本领域技术人员已知的这种治疗上有用的量。

本发明的化合物和其他抗癌剂可用推荐的最大临床剂量或更低的剂量给药。可以改变本发明组合物中活性化合物的剂量水平以获得所需的治疗反应,这取决于给药途径、疾病的严重程度和患者的反应。该组合可以作为单独的组合物或包含两种药剂的单一剂型给药。当组合给药时,可以将治疗剂配制成单独的组合物,其可以同时或不同时间给予,或者可以将治疗剂制成单一组合物。

在诸如慢性骨髓性白血病(CML)的血液系统癌症中,染色体易位是在结构上激活的BCR-ABL酪氨酸激酶的原因。由于抑制Ab1激酶活性,患病患者对小分子酪氨酸激酶抑制剂GLEEVEC[®]有反应。但是,许多患有晚期疾病的患者最初对GLEEVEC[®]有反应,但后来由于Ab1激酶域中赋予抗药性的突变而复发。体外研究表明,BCR-Av1利用Raf激酶途径引起其效应。此外,抑制同一途径中的一种以上激酶可提供额外的防护,以抵抗赋予抗药性的突变。因此,在本发明的另一方面,本发明的化合物与至少一种另外的药剂例如GLEEVEC组合用于治疗血液系统癌症如慢性骨髓性白血病(CML),以逆转或预防对至少一种另外的药剂的抗性。

在本发明的另一方面,提供了包括一种或多种本发明化合物的试剂盒。代表性的试剂盒包括本发明的化合物和包装说明书或其他标签,包括通过给予化合物的MUC1*抑制量来治疗细胞增殖性疾病的说明。

本发明不限于本文所描述的具体实施例的范围。实际上,根据本文的前述描述和附图,除本文中所描述的之外,本发明的各种修改对于本领域技术人员而言将变得显而易见。这样的修改旨在落入所附权利要求书的范围内。通过举例说明本发明而非限制的方式提供以下实施例。

示例

示例1.幼稚状态干细胞的生长。

干细胞,无论是胚胎干细胞还是诱导的多能干(iPS)细胞,都在含有人重组NME7_{AB}的基本无血清培养基中以2-32nM的浓度培养,其中优选4-8nM,更优选4nM。为促进表面附着,细胞培养板涂有浓度为2-100ug/mL的包被溶液的抗MUCP单克隆抗体,称为MN-C3或C3或MN-C8,其中优选3-50ug/mL,更优选6-12.5ug/mL。在这些实验中,使用了12.5ug/mL的MN-C3。在铺板干细胞之前,抗体包被的板在4℃下温育过夜。添加Rho激酶I抑制剂以增强表面附着。

在某些情况下,人重组NME1二聚体取代NME7_{AB},人重组NME1二聚体也诱导干细胞恢复为幼稚样状态。

示例2.始发状态干细胞的生长。

干细胞,无论是胚胎干细胞还是诱导的多能干(iPS)细胞,都在最小无血清培养基中培养,该培养基含有浓度为8ng/mL的人重组bFGF。将干细胞铺在一层失活的小鼠胚胎成纤维细胞(又名MEF)上,该细胞分泌其他未表征的生长因子和细胞因子。

示例3.转移癌抑制剂的药物筛选。

将人的幼稚状态和始发状态干细胞平行培养至少5代,以保证正常的无分化生长。将干细胞铺板在12孔细胞培养板中,每孔50,000个细胞。将细胞在其各自的培养基(bFGF培养基或NME7_{AB}培养基)中培养24h。当指示时,然后除去培养基,并用不含bFGF或NME7_{AB}的培养基代替。以指示的浓度将测试其诱导幼稚干细胞分化能力的药剂加入培养基中。72h后,拍摄照片,见图1-10。

示例4.癌症或转移性癌症抑制剂的药物筛选。

将人类幼稚状态和始发干细胞平行培养至少5代,以保证正常的无分化生长。将干细胞铺板在12孔细胞培养板中,每孔50,000个细胞。将细胞在其各自的培养基,bFGF培养基或NME7_{AB}培养基中培养24h。然后除去培养基,并用不含bFGF或NME7_{AB}的培养基代替。加入500nM或1 μ M的BRD4抑制剂JQ1或非活性立体异构体,并测试其诱导幼稚干细胞分化的能力。48h后更换培养基,并用含有BRD4抑制剂的新鲜培养基替换。4天后,实验停止。拍摄照片并收集细胞沉淀以进一步分析,请参见图11-16。

示例5.迁移测定

对于癌细胞迁移实验,将癌细胞以不同的密度接种到Oris细胞迁移测定胶原蛋白-1包被的96孔板(Platypus Technologies LLC, Madison, WI)中。胶原蛋白-1包被的96孔板结合了一个特定的真空塞,该真空塞附着在每个孔的底部,从而形成了一个细胞无法生长的区域。将细胞以高密度接种到每个孔中后,给它们18-24h的时间段以附着到孔的底部。24h后将塞子从板中取出,然后将小分子类似物添加到孔中。拍摄每个孔的图像,并表示每个孔的时间0(T=0)。在24、48、72、96和120h的时间点拍摄孔的图像。使用在这些特定时间点拍摄的图像进行数据分析。将图像导入ImageJ(Rasband, W.S., Image J, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016.),并计算出没有细胞的区域。为了确定小分子类似物相对于DMSO对照的有效性,将在每个时间点收集的面积与T=0图像的面积进行比较,从而得到每个孔剩余的百分比面积。然后在每个实验中将收集到的数据标准化为DMSO对照。

示例6.增殖测定

对于癌细胞增殖实验,将癌细胞以恒定密度(6000细胞/孔)平板接种到96孔白壁/透明底组织培养处理的平板(Coming Incorporated, Big Flats, NY)中。在具有2%FBS的培养基中,在T=24h加入小分子类似物。加入小分子后,在铺板后24、48、72和96h目测确认/检查,细胞在120h内保持不变。在该120h标记时,在板上进行钙黄绿素荧光测定(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)。钙黄绿素荧光(终浓度为0.5 μ M)用于评估细胞活力。在TECAN SAFIRE²分光光度计板阅读器中测量癌细胞的荧光。然后使用Olympus 1X71荧光成像显微镜对该板成图像,并使用Image J组装所得图像的蒙太奇(montage)。

参考文献

Nichols J,Smith A.Naive and primed pluripotent states.Cell Stem Cell.2009;4:487-492.

Silva J,Barrandon O,Nichols J,Kawaguchi J,Theunissen TW,A Smith,Promotion of reprogramming to ground state Pluripotency by signal inhibition.PLoS Biol.2008;6:e253.

Gafni O,Weinberger L,Mansour AA,Manor YS,Chomsky E,Ben-Yosef D,Kalma Y,Viukov S,Maza I,Zviran A,Rais Y,Shipony Z,Mukamel Z,Krupalnik V,Zerbib M,Geula S,Caspi I,Schneir D,Shwartz T,Gilad S,Amann-Zalcenstein D,Benjamin S,Amit I,Tanay A,Massarwa R,Novershtern N,Hanna JH.Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells.Nature.2013;504:282-286.

Theunissen TW,Powell BE,Wang H,Mitalipova M,Faddah DA,Reddy J,Fan ZP,Maetzel D,Ganz K,Shi L,Lungjangwa T,Imsoonthornruksa S,Stelzer Y,Rangarajan S,D'Alessio A,Zhang J,Gao Q,Dawlaty MM,Young RA,Gray NS,Jaenisch R.Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency.Cell Stem Cell.2014;15:471-487.

Smaghe BJ,Stewart AK,Carter MG et al.MUC1*ligand,NM23-H1,is a novel growth factor that maintains human stem cells in a more naive state.PLoS One.2013;8:e58601.

Hikita ST,Kosik KS,Clegg DO et al.MUC1*mediates the growth of human pluripotent stem cells.PLoS One.2008;3:e3312.

Hanna J,Cheng AW,Saha K,Kim J,Lengner CJ,Soldner F,Cassady JP,Muffat J,Carey BW,Jaenisch R..Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs.Proc Natl Acad Sci U S A.2010;107:9222-9227.

Ware CB,Nelson AM,Mecham B,Hesson J,Zhou W,Jonlin EC,Jimenez-Caliani AJ,Deng X,Cavanaugh C,Cook S,Tesar PJ,Okada J,Margaretha L,Sperber H,Choi M,Blau CA,Treuting PM,Hawkins RD,Cirulli V,Ruohola-Baker H..Derivation of naive human embryonic stem cells.Proc Natl Acad Sci U S A.2014;111:4484-4489.

Belkina AC,Nikolajczyk BS,Denis GV.BET protein function is required for inflammation:Brd2 genetic disruption and BET inhibitor JQ1 impair mouse macrophage inflammatory responses.J Immunol.2013;190(7):3670-8.

Tang X,Peng R,Phillips JE,Deguzman J,Ren Y,Apparsundaram S,Luo Q,Bauer CM,Fuentes ME,DeMartino JA,Tyagi G,Garrido R,Hogaboam CM,Denton CP,Holmes AM,Kitson C,Stevenson CS,Budd DC.Assessment of Brd4 inhibition in idiopathic pulmonary fibrosis lung fibroblasts and in vivo models of lung fibrosis.Am J Pathol.2013 183(2):470-9

Filippakopoulos P,Qi J,Picaud S,Shen Y,Smith WB,Fedorov O,Morse EM,Keates T,Hickman TT,Felletar I,Philpott M,Munro S,McKeown MR,Wang Y,Christie AL,West

N,Cameron MJ,Schwartz B,Heightman TD,La Thangue N,French CA,Wiest O,Kung AL,Knapp S,Bradner JE.Selective inhibition of BET bromodomains.Nature.2010;468(7327):1067-73

Tang X,Peng R,Phillips JE,deguzman J,Ren Y,Apparsundaram S,Luo Q,Bauer CM,Fuentes ME,DeMartino JA,Tyagi G,Garrido R,Hogaboam CM,Denton CP,Holmes AM,Kitson C,Stevenson CS,Budd DC..Assessment of Brd4 inhibition in idiopathic pulmonary fibrosis lung fibroblasts and in vivo models of lung fibrosis.Am J Pathol.2013;183(2):470-9

Horn TM,Bitler BG,Broka DM,Louderbough JM,Schroeder JA.MUC1 drives c-Met-dependent migration and scattering.Mol Cancer Res.2012 10(12):1544-54

Meng XG,Yue SW.Dexamethasone disrupts cytoskeleton organization and migration of T47D Human breast cancer cells by modulating the AKT/mTOR/RhoA pathway.Asian Pac J Cancer Prev.2014;15(23):10245-50.

Zheng C¹,Fang Y,Tong W,Li G,Wu H,Zhou W,Lin Q,Yang F,Yang Z,Wang P,Peng Y,Pang X,Yi Z,Luo J,Liu M,Chen Y.Synthesis and biological evaluation of novel tetrahydro- β -carboline derivatives as antitumor growth and metastasis agents through inhibiting the transforming growth factor- β signaling pathway.J Med Chem.2014;57(3)

Carter MG,Smaghe BJ,Stewart AK,Rapley JA,Lynch E,Bernier KJ,Keating KW,Hatzioannou VM,Hartman EJ,Bamdad CC.A Primitive Growth Factor,NME7AB,Is Sufficient to Induce Stable **Naïve** State Human Pluripotency;Reprogramming in This Novel Growth Factor Confers Superior Differentiation.Stem Cells.2016;34(4):847-59.

Mani SA,Guo W,Liao MJ,Eaton EN,Ayyanan A,Zhou AY,Brooks M,Reinhard F,Zhang CC,Shipitsin M,Campbell LL,Polyak K,Brisken C,Yang J,Weinberg RA.The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells.Cell.2008;133(4)

S.Meng,L,Zhang,Y.Tang,Q.Tu,L,Zheng,L,Yu,D.Murray,J.Cheng,S.H.Kim,X.Zhou and J.Chen,BET Inhibitor JQ1 Blocks Inflammation and Bone Destruction.J Dent Res.2014;93(7):657-662.

本文引用的所有参考文献通过引用整体并入本文。

本领域技术人员仅使用常规实验就将认识到或能够确定本文具体描述的本发明的具体实施方案的许多等同形式。

序列表

- <110> 米纳瓦生物技术公司
 <120> 分化干细胞和治疗癌症的药剂
 <130> 13150-70149PCT
 <150> US 62/478,382
 <151> 2017-03-29
 <150> US 62/607,880
 <151> 2017-12-19
 <160> 12
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 1255
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 全长MUC1受体 (Mucin 1前体, Genbank 登录号: P15941)
 <400> 1

```

Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Leu Thr
1           5           10           15
Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly
           20           25           30
Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser
           35           40           45
Thr Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser His
           50           55           60
Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val Thr Leu
65           70           75           80
Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Thr Trp Gly Gln
           85           90           95
Asp Val Thr Ser Val Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Thr
           100          105          110
Pro Pro Ala His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro
           115          120          125
Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
           130          135          140
Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
145          150          155          160
Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
  
```

				165					170					175				
Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala			
				180					185					190				
Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro			
				195					200					205				
Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr			
				210					215					220				
Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser			
225							230							235				240
Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His			
				245					250					255				
Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala			
				260					265					270				
Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro			
				275					280					285				
Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr			
				290					295					300				
Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser			
305							310							315				320
Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His			
				325					330					335				
Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala			
				340					345					350				
Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro			
				355					360					365				
Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr			
				370					375					380				
Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser			
385							390							395				400
Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His			
				405					410					415				
Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala			
				420					425					430				
Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr	Arg	Pro	Ala	Pro			
				435					440					445				
Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Asp	Thr			
				450					455					460				
Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Ser	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	His	Gly	Val	Thr	Ser			
465							470							475				480

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
485 490 495

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
500 505 510

Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
515 520 525

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
530 535 540

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
545 550 555 560

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
565 570 575

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
580 585 590

Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
595 600 605

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
610 615 620

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
625 630 635 640

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
645 650 655

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
660 665 670

Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
675 680 685

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
690 695 700

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
705 710 715 720

Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His
725 730 735

Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
740 745 750

Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro
755 760 765

Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
770 775 780

Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser

785	790	795	800
Ala Pro Asp Thr Arg	Pro Ala Pro Gly Ser Thr	Ala Pro Pro Ala His	
	805	810	815
Gly Val Thr Ser Ala	Pro Asp Thr Arg	Pro Ala Pro Gly Ser Thr	Ala
	820	825	830
Pro Pro Ala His Gly	Val Thr Ser Ala	Pro Asp Thr Arg	Pro Ala Pro
	835	840	845
Gly Ser Thr Ala Pro	Pro Ala His Gly	Val Thr Ser Ala	Pro Asp Thr
	850	855	860
Arg Pro Ala Pro Gly	Ser Thr Ala Pro	Pro Ala His Gly	Val Thr Ser
865	870	875	880
Ala Pro Asp Thr Arg	Pro Ala Pro Gly	Ser Thr Ala Pro	Pro Ala His
	885	890	895
Gly Val Thr Ser Ala	Pro Asp Thr Arg	Pro Ala Pro Gly	Ser Thr Ala
	900	905	910
Pro Pro Ala His Gly	Val Thr Ser Ala	Pro Asp Thr Arg	Pro Ala Pro
	915	920	925
Gly Ser Thr Ala Pro	Pro Ala His Gly	Val Thr Ser Ala	Pro Asp Asn
	930	935	940
Arg Pro Ala Leu Gly	Ser Thr Ala Pro	Pro Val His Asn	Val Thr Ser
945	950	955	960
Ala Ser Gly Ser Ala	Ser Gly Ser Ala	Ser Thr Leu Val	His Asn Gly
	965	970	975
Thr Ser Ala Arg Ala	Thr Thr Thr Pro	Ala Ser Lys Ser	Thr Pro Phe
	980	985	990
Ser Ile Pro Ser His	His Ser Asp Thr	Pro Thr Thr Leu	Ala Ser His
	995	1000	1005
Ser Thr Lys Thr Asp	Ala Ser Ser Thr	His His Ser Ser	Val Pro
	1010	1015	1020
Pro Leu Thr Ser Ser	Asn His Ser Thr	Ser Pro Gln Leu	Ser Thr
	1025	1030	1035
Gly Val Ser Phe Phe	Phe Leu Ser Phe	His Ile Ser Asn	Leu Gln
	1040	1045	1050
Phe Asn Ser Ser Leu	Glu Asp Pro Ser	Thr Asp Tyr Tyr	Gln Glu
	1055	1060	1065
Leu Gln Arg Asp Ile	Ser Glu Met Phe	Leu Gln Ile Tyr	Lys Gln
	1070	1075	1080
Gly Gly Phe Leu Gly	Leu Ser Asn Ile	Lys Phe Arg Pro	Gly Ser
	1085	1090	1095

Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn
 1100 1105 1110
 Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala
 1115 1120 1125
 Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp
 1130 1135 1140
 Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly
 1145 1150 1155
 Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala Leu
 1160 1165 1170
 Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg
 1175 1180 1185
 Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr
 1190 1195 1200
 His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly Arg Tyr
 1205 1210 1215
 Val Pro Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val Ser
 1220 1225 1230
 Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val
 1235 1240 1245
 Ala Ala Ala Ser Ala Asn Leu
 1250 1255

<210> 2

<211> 146

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 在N端具有nat-PSMGFR、包括全长MUC1受体的跨膜和胞质序列的截短的MUC1受体同种型

<400> 2

Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys
 1 5 10 15
 Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val
 20 25 30
 Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val Pro
 35 40 45
 Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala Leu
 50 55 60
 Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg Lys

65	70	75	80
Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr His Pro			
	85	90	95
Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro Pro			
	100	105	110
Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn Gly			
	115	120	125
Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val Ala Ala Ala Ser Ala			
	130	135	140
Asn Leu			
145			
<210> 3			
<211> 45			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> MUC1生长因子受体的天然原始序列的胞外结构域 (nat-PSMGFR - "PSMGFR"的实例)			
<400> 3			
Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys			
1	5	10	15
Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val			
	20	25	30
Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala			
	35	40	45
<210> 4			
<211> 35			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> PSMGFR的N-10肽,其中N端去除了10个氨基酸			
<400> 4			
Gln Phe Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr			
1	5	10	15
Ile Ser Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln			
	20	25	30
Ser Gly Ala			
	35		
<210> 5			

<211> 283
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> NME7氨基酸序列 (NME7: GENBANK登录 AB209049)
 <400> 5
 Asp Pro Glu Thr Met Asn His Ser Glu Arg Phe Val Phe Ile Ala Glu
 1 5 10 15
 Trp Tyr Asp Pro Asn Ala Ser Leu Leu Arg Arg Tyr Glu Leu Leu Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Gly Asp Gly Ser Val Glu Met His Asp Val Lys Asn His Arg
 35 40 45
 Thr Phe Leu Lys Arg Thr Lys Tyr Asp Asn Leu His Leu Glu Asp Leu
 50 55 60
 Phe Ile Gly Asn Lys Val Asn Val Phe Ser Arg Gln Leu Val Leu Ile
 65 70 75 80
 Asp Tyr Gly Asp Gln Tyr Thr Ala Arg Gln Leu Gly Ser Arg Lys Glu
 85 90 95
 Lys Thr Leu Ala Leu Ile Lys Pro Asp Ala Ile Ser Lys Ala Gly Glu
 100 105 110
 Ile Ile Glu Ile Ile Asn Lys Ala Gly Phe Thr Ile Thr Lys Leu Lys
 115 120 125
 Met Met Met Leu Ser Arg Lys Glu Ala Leu Asp Phe His Val Asp His
 130 135 140
 Gln Ser Arg Pro Phe Phe Asn Glu Leu Ile Gln Phe Ile Thr Thr Gly
 145 150 155 160
 Pro Ile Ile Ala Met Glu Ile Leu Arg Asp Asp Ala Ile Cys Glu Trp
 165 170 175
 Lys Arg Leu Leu Gly Pro Ala Asn Ser Gly Val Ala Arg Thr Asp Ala
 180 185 190
 Ser Glu Ser Ile Arg Ala Leu Phe Gly Thr Asp Gly Ile Arg Asn Ala
 195 200 205
 Ala His Gly Pro Asp Ser Phe Ala Ser Ala Ala Arg Glu Met Glu Leu
 210 215 220
 Phe Phe Pro Ser Ser Gly Gly Cys Gly Pro Ala Asn Thr Ala Lys Phe
 225 230 235 240
 Thr Asn Cys Thr Cys Cys Ile Val Lys Pro His Ala Val Ser Glu Gly
 245 250 255
 Met Leu Asn Thr Leu Tyr Ser Val His Phe Val Asn Arg Arg Ala Met

	260		265		270
Phe Ile Phe	Leu Met Tyr Phe	Met Tyr Arg Lys			
	275		280		
<210>	6				
<211>	286				
<212>	PRT				
<213>	人工序列				
<220>					
<223>	人NME7-AB				
<400>	6				
Met Glu Lys Thr	Leu Ala Leu Ile Lys Pro Asp Ala Ile Ser Lys Ala				
1	5		10		15
Gly Glu Ile Ile	Glu Ile Ile Asn Lys Ala Gly Phe Thr Ile Thr Lys				
	20		25		30
Leu Lys Met Met	Met Leu Ser Arg Lys Glu Ala Leu Asp Phe His Val				
	35		40		45
Asp His Gln Ser	Arg Pro Phe Phe Asn Glu Leu Ile Gln Phe Ile Thr				
	50		55		60
Thr Gly Pro Ile	Ile Ala Met Glu Ile Leu Arg Asp Asp Ala Ile Cys				
65	70		75		80
Glu Trp Lys Arg	Leu Leu Gly Pro Ala Asn Ser Gly Val Ala Arg Thr				
	85		90		95
Asp Ala Ser Glu	Ser Ile Arg Ala Leu Phe Gly Thr Asp Gly Ile Arg				
	100		105		110
Asn Ala Ala His	Gly Pro Asp Ser Phe Ala Ser Ala Ala Arg Glu Met				
	115		120		125
Glu Leu Phe Phe	Pro Ser Ser Gly Gly Cys Gly Pro Ala Asn Thr Ala				
	130		135		140
Lys Phe Thr Asn	Cys Thr Cys Cys Ile Val Lys Pro His Ala Val Ser				
145	150		155		160
Glu Gly Leu Leu	Gly Lys Ile Leu Met Ala Ile Arg Asp Ala Gly Phe				
	165		170		175
Glu Ile Ser Ala	Met Gln Met Phe Asn Met Asp Arg Val Asn Val Glu				
	180		185		190
Glu Phe Tyr Glu	Val Tyr Lys Gly Val Val Thr Glu Tyr His Asp Met				
	195		200		205
Val Thr Glu Met	Tyr Ser Gly Pro Cys Val Ala Met Glu Ile Gln Gln				
	210		215		220
Asn Asn Ala Thr	Lys Thr Phe Arg Glu Phe Cys Gly Pro Ala Asp Pro				

195	200	205
Ala Arg His Leu Arg Pro Gly Thr Leu Arg Ala Ile Phe Gly Lys Thr		
210	215	220
Lys Ile Gln Asn Ala Val His Cys Thr Asp Leu Pro Glu Asp Gly Leu		
225	230	235
240		
Leu Glu Val Gln Tyr Phe Phe Lys Ile Leu Asp Asn		
245	250	
<210> 8		
<211> 132		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人NME7-A1		
<400> 8		
Met Glu Lys Thr Leu Ala Leu Ile Lys Pro Asp Ala Ile Ser Lys Ala		
1	5	10
15		
Gly Glu Ile Ile Glu Ile Ile Asn Lys Ala Gly Phe Thr Ile Thr Lys		
20	25	30
Leu Lys Met Met Met Leu Ser Arg Lys Glu Ala Leu Asp Phe His Val		
35	40	45
Asp His Gln Ser Arg Pro Phe Phe Asn Glu Leu Ile Gln Phe Ile Thr		
50	55	60
Thr Gly Pro Ile Ile Ala Met Glu Ile Leu Arg Asp Asp Ala Ile Cys		
65	70	75
80		
Glu Trp Lys Arg Leu Leu Gly Pro Ala Asn Ser Gly Val Ala Arg Thr		
85	90	95
Asp Ala Ser Glu Ser Ile Arg Ala Leu Phe Gly Thr Asp Gly Ile Arg		
100	105	110
Asn Ala Ala His Gly Pro Asp Ser Phe Ala Ser Ala Ala Arg Glu Met		
115	120	125
Glu Leu Phe Phe		
130		
<210> 9		
<211> 155		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人NME7-B3		
<400> 9		

Met Pro Ser Ser Gly Gly Cys Gly Pro Ala Asn Thr Ala Lys Phe Thr
 1 5 10 15
 Asn Cys Thr Cys Cys Ile Val Lys Pro His Ala Val Ser Glu Gly Leu
 20 25 30
 Leu Gly Lys Ile Leu Met Ala Ile Arg Asp Ala Gly Phe Glu Ile Ser
 35 40 45
 Ala Met Gln Met Phe Asn Met Asp Arg Val Asn Val Glu Glu Phe Tyr
 50 55 60
 Glu Val Tyr Lys Gly Val Val Thr Glu Tyr His Asp Met Val Thr Glu
 65 70 75 80
 Met Tyr Ser Gly Pro Cys Val Ala Met Glu Ile Gln Gln Asn Asn Ala
 85 90 95
 Thr Lys Thr Phe Arg Glu Phe Cys Gly Pro Ala Asp Pro Glu Ile Ala
 100 105 110
 Arg His Leu Arg Pro Gly Thr Leu Arg Ala Ile Phe Gly Lys Thr Lys
 115 120 125
 Ile Gln Asn Ala Val His Cys Thr Asp Leu Pro Glu Asp Gly Leu Leu
 130 135 140
 Glu Val Gln Tyr Phe Phe Lys Ile Leu Asp Asn
 145 150 155

<210> 10

<211> 29

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> B3, 其是NME7B肽3 (B结构域)

<400> 10

Ala Ile Phe Gly Lys Thr Lys Ile Gln Asn Ala Val His Cys Thr Asp
 1 5 10 15
 Leu Pro Glu Asp Gly Leu Leu Glu Val Gln Tyr Phe Phe
 20 25

<210> 11

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有增强稳定性的MUC1生长因子受体的天然原始序列的“SPY”功能变体的胞外结构域 (var-PSMGFR - “PSMGFR”的实例)

<400> 11

Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr Lys
 1 5 10 15
 Thr Glu Ala Ala Ser Pro Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser Val
 20 25 30
 Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala
 35 40 45
 <210> 12
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> NME7的DM10结构域
 <400> 12
 Met Asn His Ser Glu Arg Phe Val Phe Ile Ala Glu Trp Tyr Asp Pro
 1 5 10 15
 Asn Ala Ser Leu Leu Arg Arg Tyr Glu Leu Leu Phe Tyr Pro Gly Asp
 20 25 30
 Gly Ser Val Glu Met His Asp Val Lys Asn His Arg Thr Phe Leu Lys
 35 40 45
 Arg Thr Lys Tyr Asp Asn Leu His Leu Glu Asp Leu Phe Ile Gly Asn
 50 55 60
 Lys Val Asn Val Phe Ser Arg Gln Leu Val Leu Ile Asp Tyr Gly Asp
 65 70 75 80
 Gln Tyr Thr Ala Arg Gln Leu Gly Ser Arg Lys
 85 90

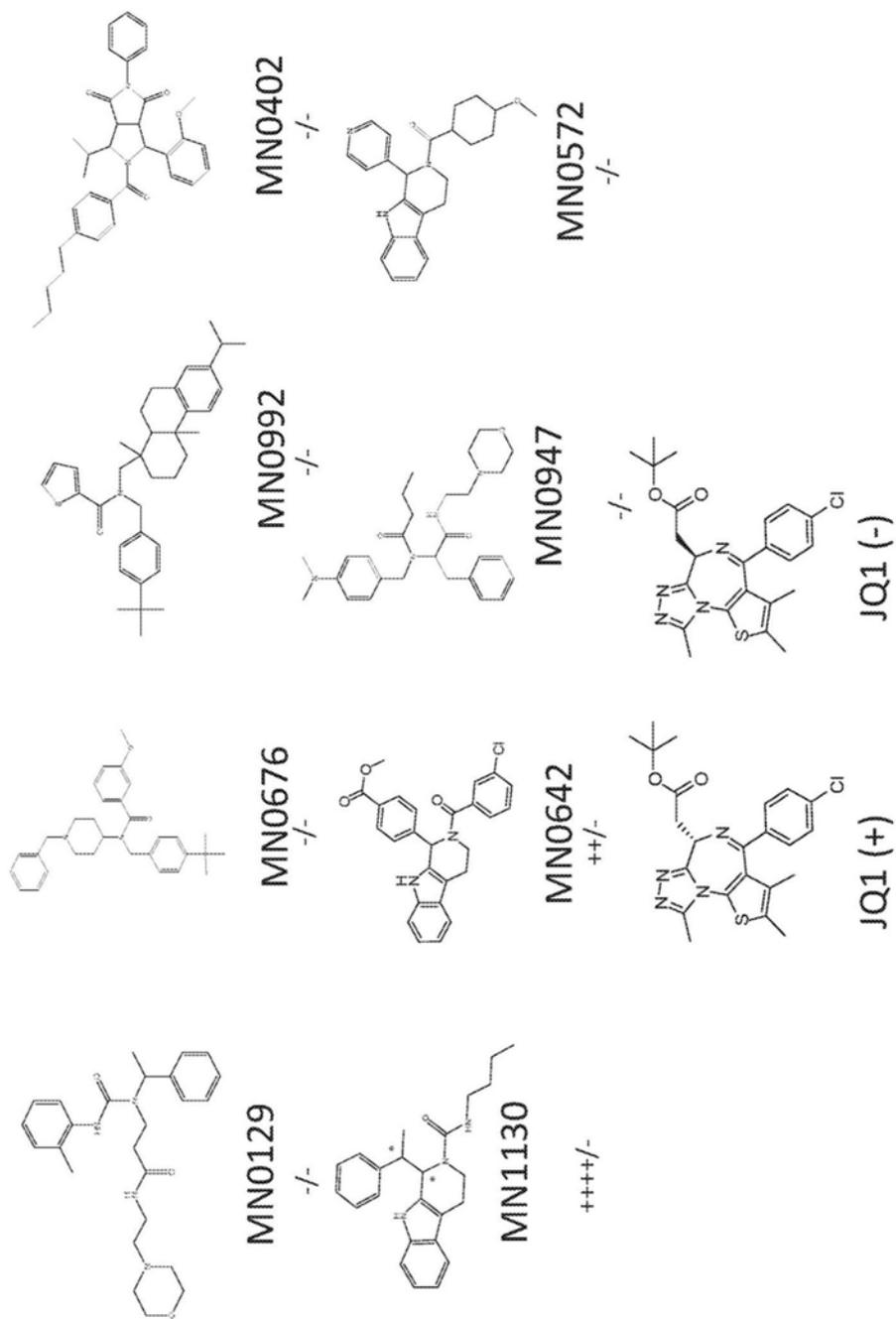


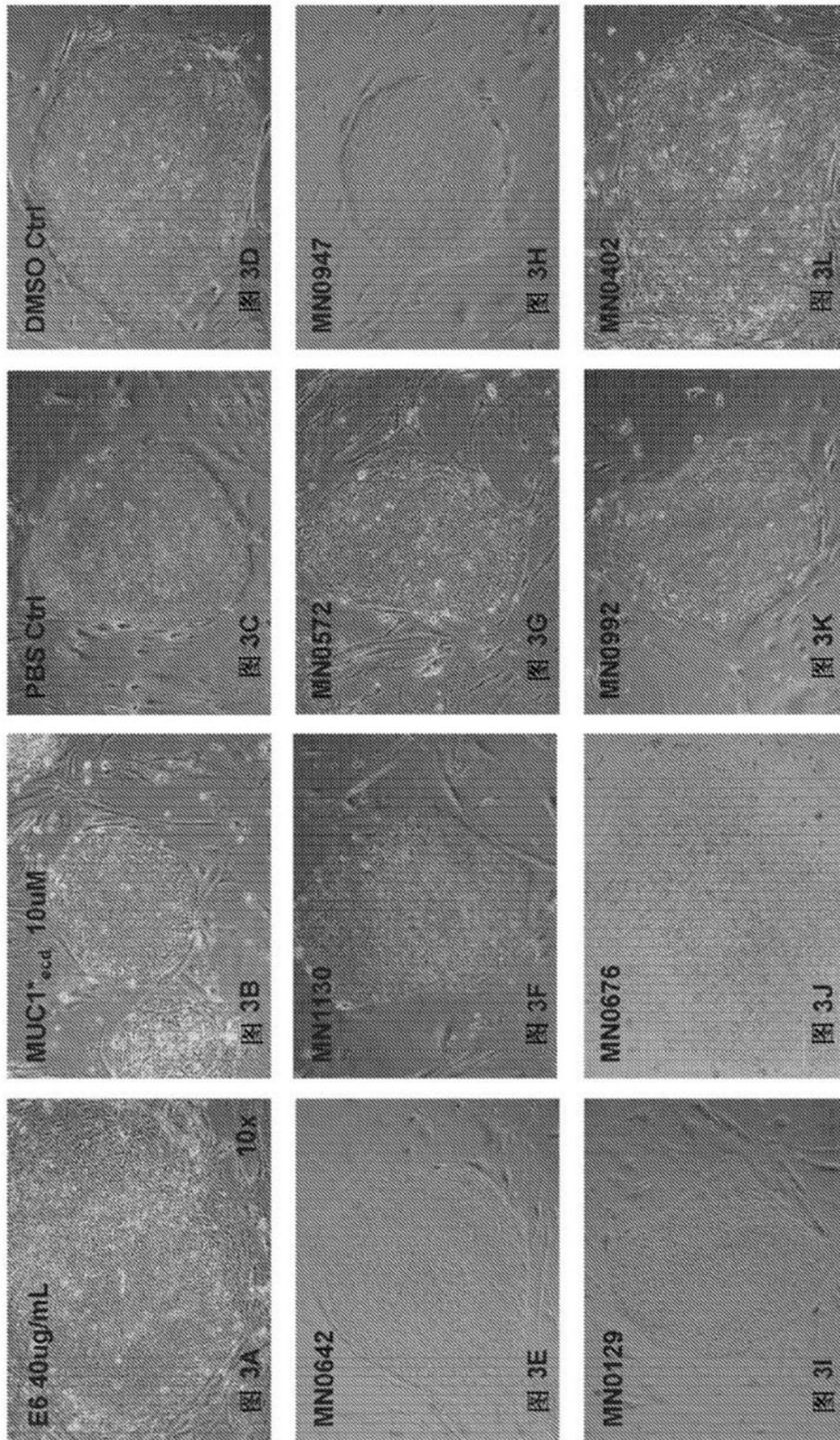
图1

干细胞药物筛选结果的总结：将候选药物添加到幼稚干细胞与始发干细胞，在96h时拍摄；小分子剂量为一次6 μ M；“-”表示在6 μ M时没有抑制多能性或增殖，“+”表示抑制了多能性或增殖；ND =无数据

化合物	始发干细胞 FGF在MEP上	始发干细胞 实验期间无生 长因子	MNC3抗体表面上 的幼稚干细胞 NME7 _{Ab}	幼稚干细胞实验 期间无生长因子
E6 Fab 40 ug/mL	-	-	+	++
MUC1* _{ecd} 肽 10 uM	-	-	+	++
PBS 对照	-	ND	-	ND
DMSO 0.2% 对照	-	ND	-	ND
Anti-NME7 Ab #56	ND	-	ND	-
Anti-NME7 Ab #61	ND	-	ND	++
MN0642	-	-	++	++
MN1130	+	+	++++	++++
MN0572	-	+	-	+
MN0947	-	-	-	-
MN0129	-	-	-	-
MN0676	-	-	-	-
MN0402	-	-	-	-
MN0992	-	-	-	-

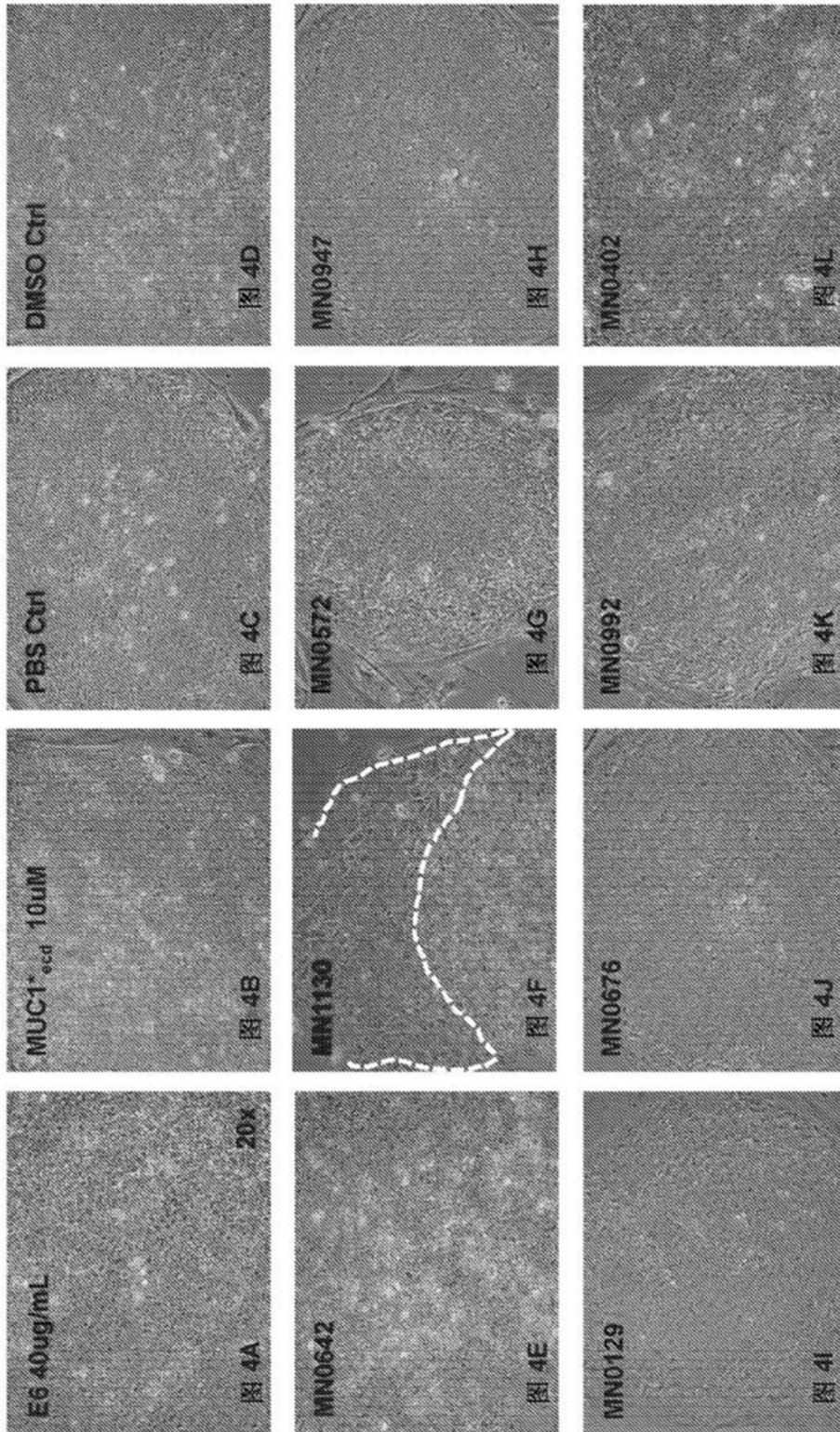
图2

始发状态干细胞：人ES细胞在bFGF中、MEF上生长 96h；
测试期间将bFGF添加到培养基中，放大10倍



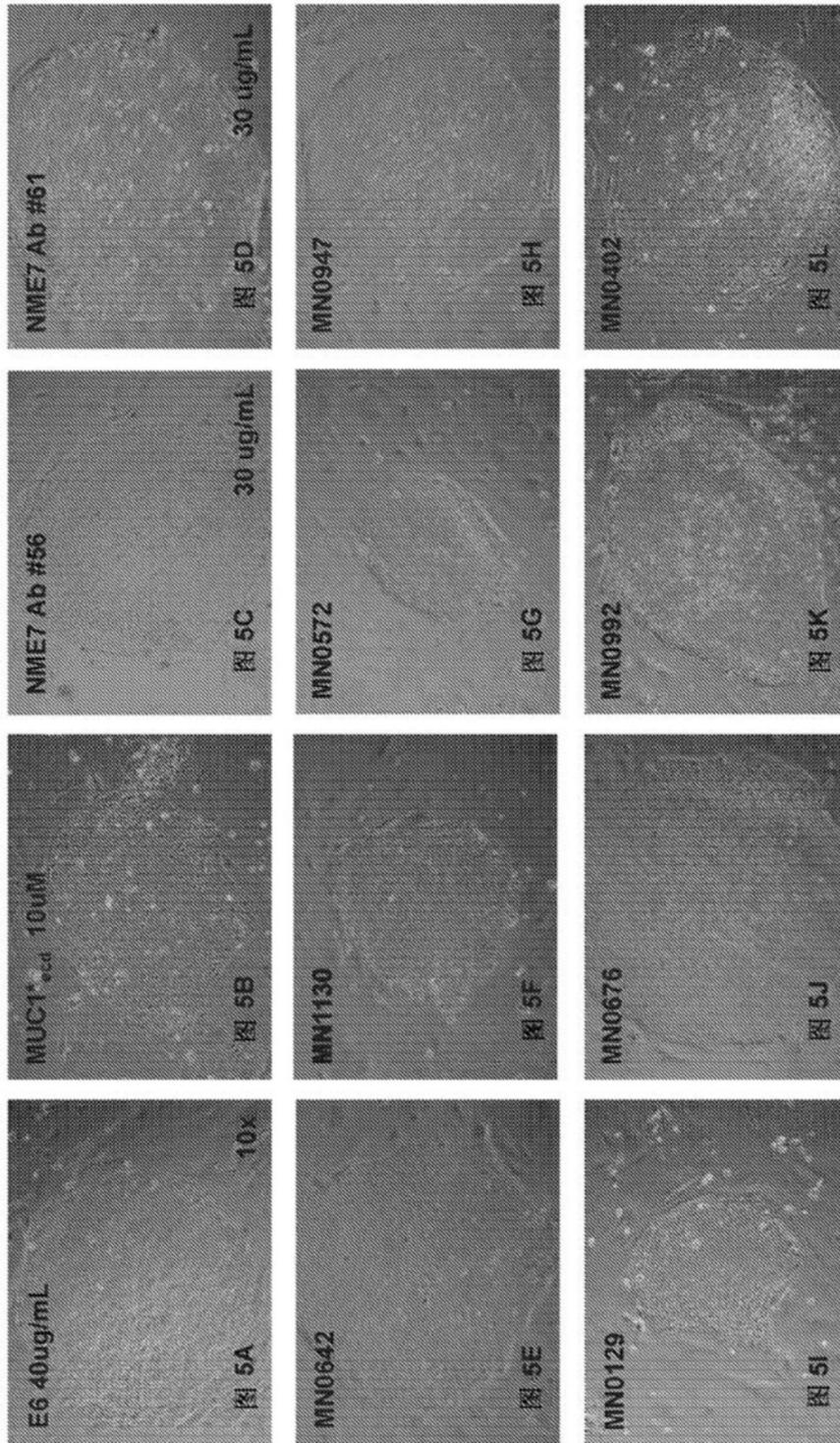
所有化合物以6 μM存在于0.2%DMSO中

始发状态干细胞：人ES细胞在bFGF中、MEF上生长96h；
测试期间将bFGF添加到培养基中，放大20倍



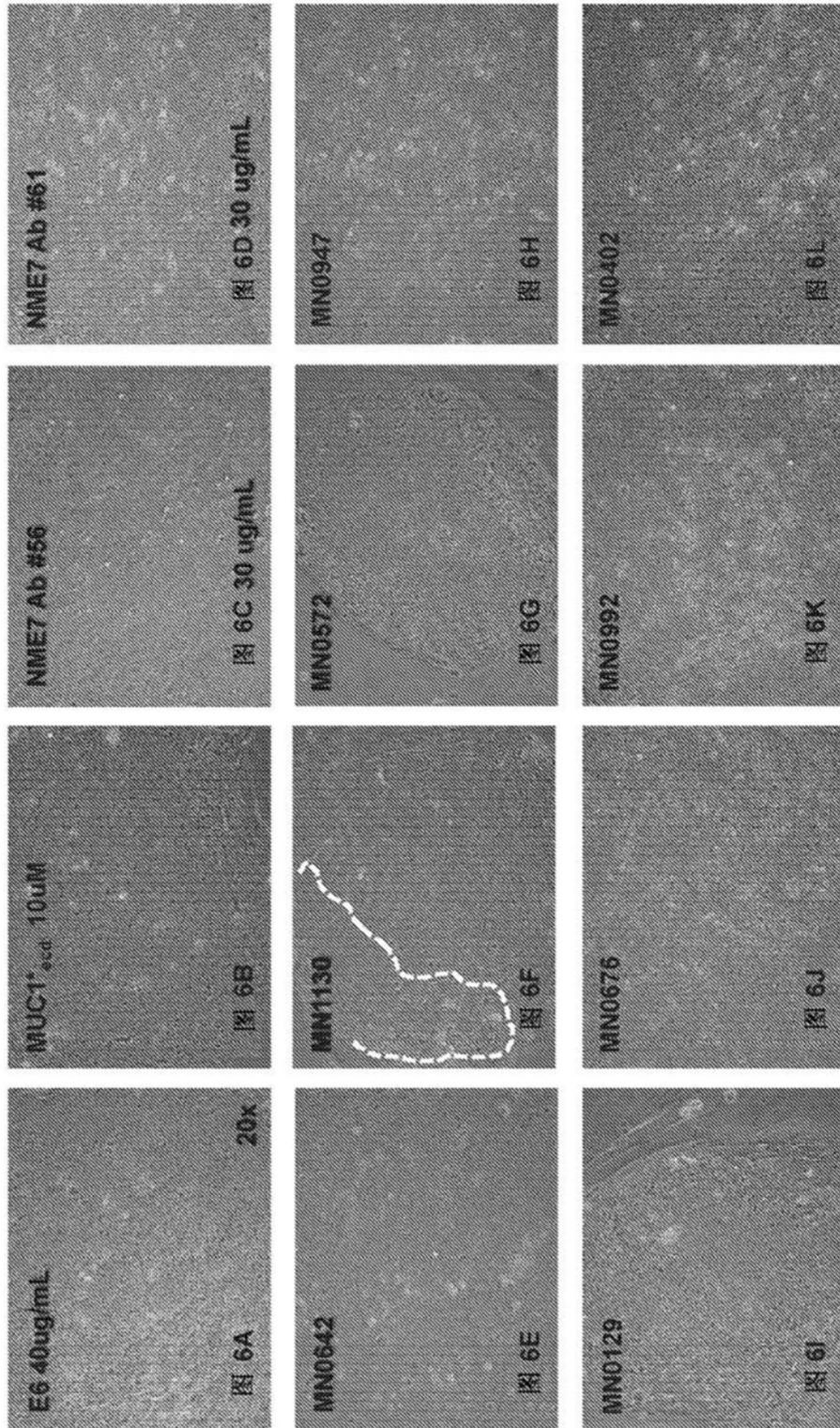
所有化合物以6 μ M存在于0.2%DMSO中

始发状态干细胞：人ES细胞在bFGF中、MEF上生长96h；
测试期间未将bFGF添加到培养基中，放大10倍



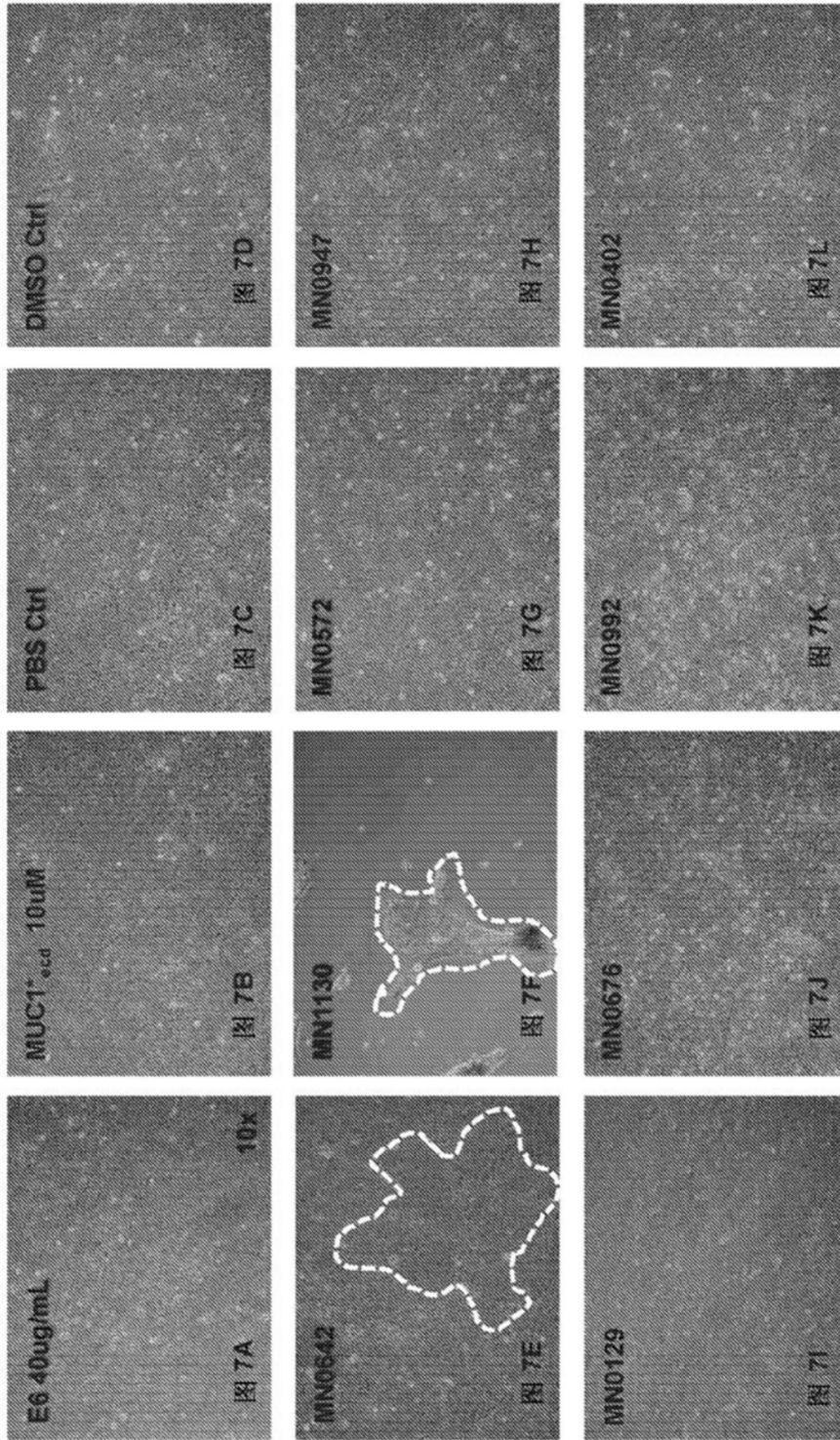
所有化合物以6 μM存在于0.2%DMSO中

始发状态干细胞：人ES细胞在bFGF中、MEF上生长96h：
测试期间未将bFGF添加到培养基中，放大20倍



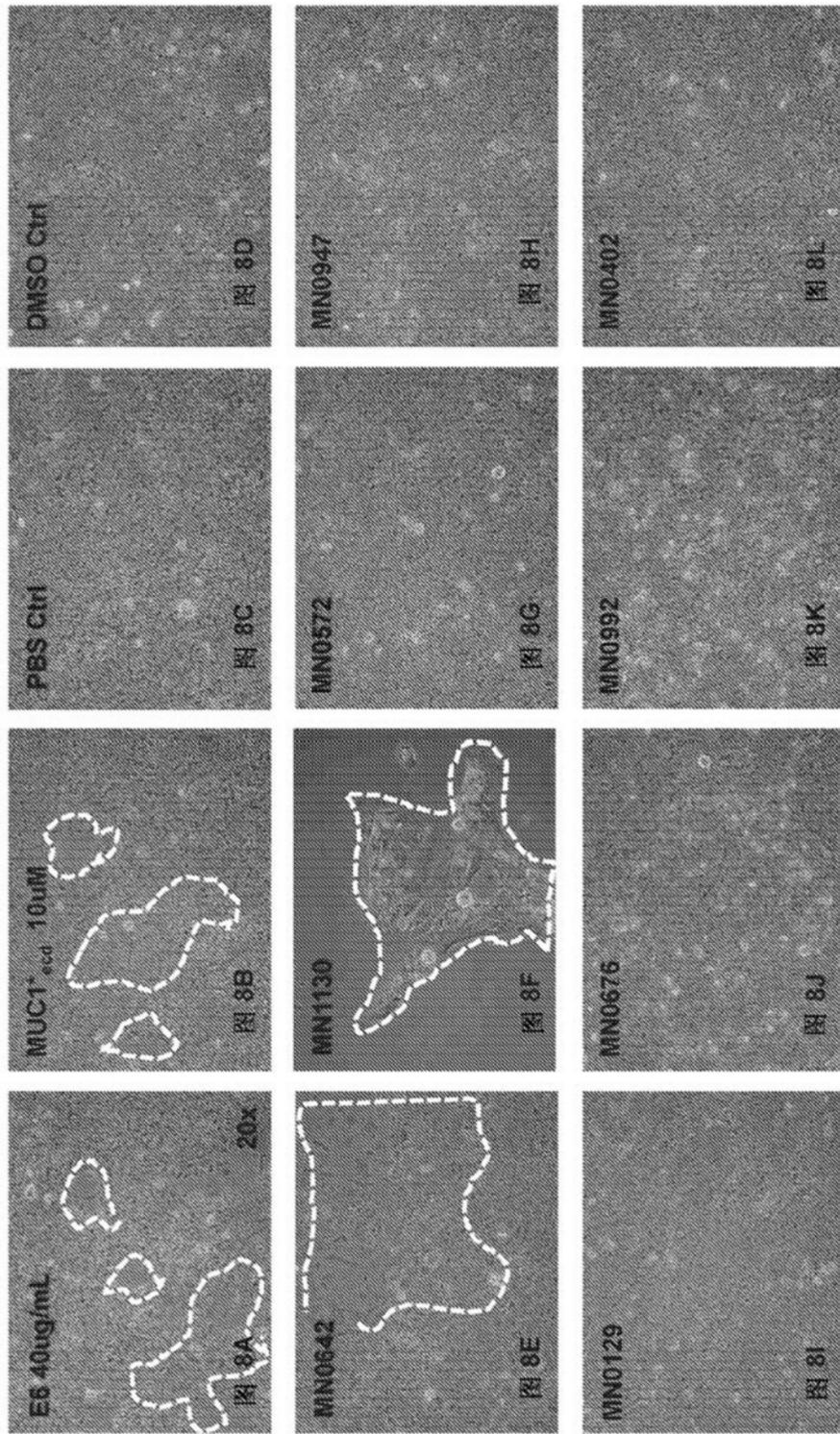
所有化合物以6 μM存在于0.2%DMSO中

幼稚状态干细胞：人ES细胞在NME7-AB中、抗MUC1* (MN-C3) 上生长96h
在测试期间将NME7-AB添加到培养基中，放大10倍



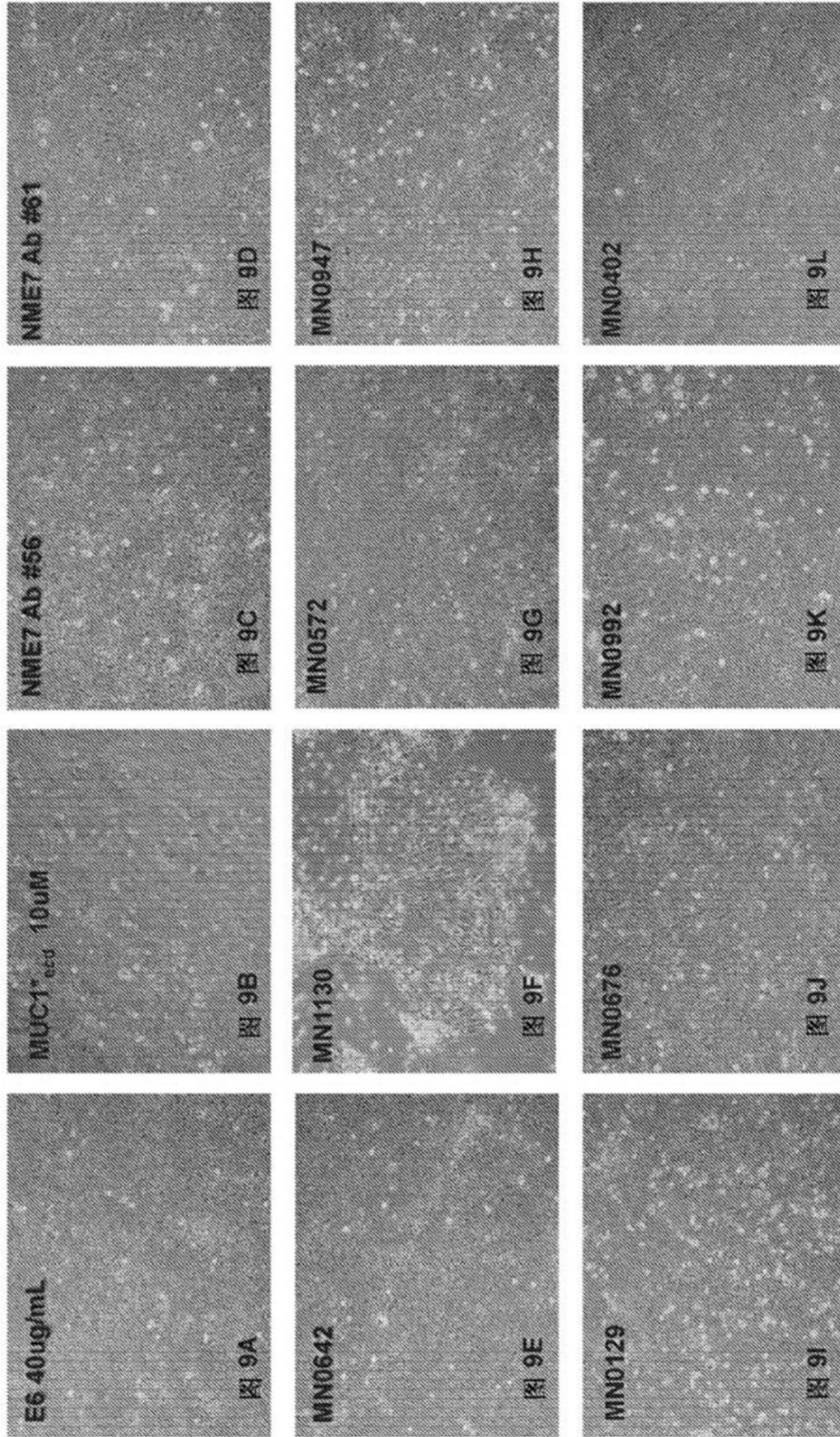
所有化合物以6 μ M存在于0.2%DMSO中

幼稚状态干细胞：人ES细胞在NME7-AB中、抗-MUC1* (MN-C3) 上生长96h
测试期间将NME7-AB添加到培养基中，放大20倍



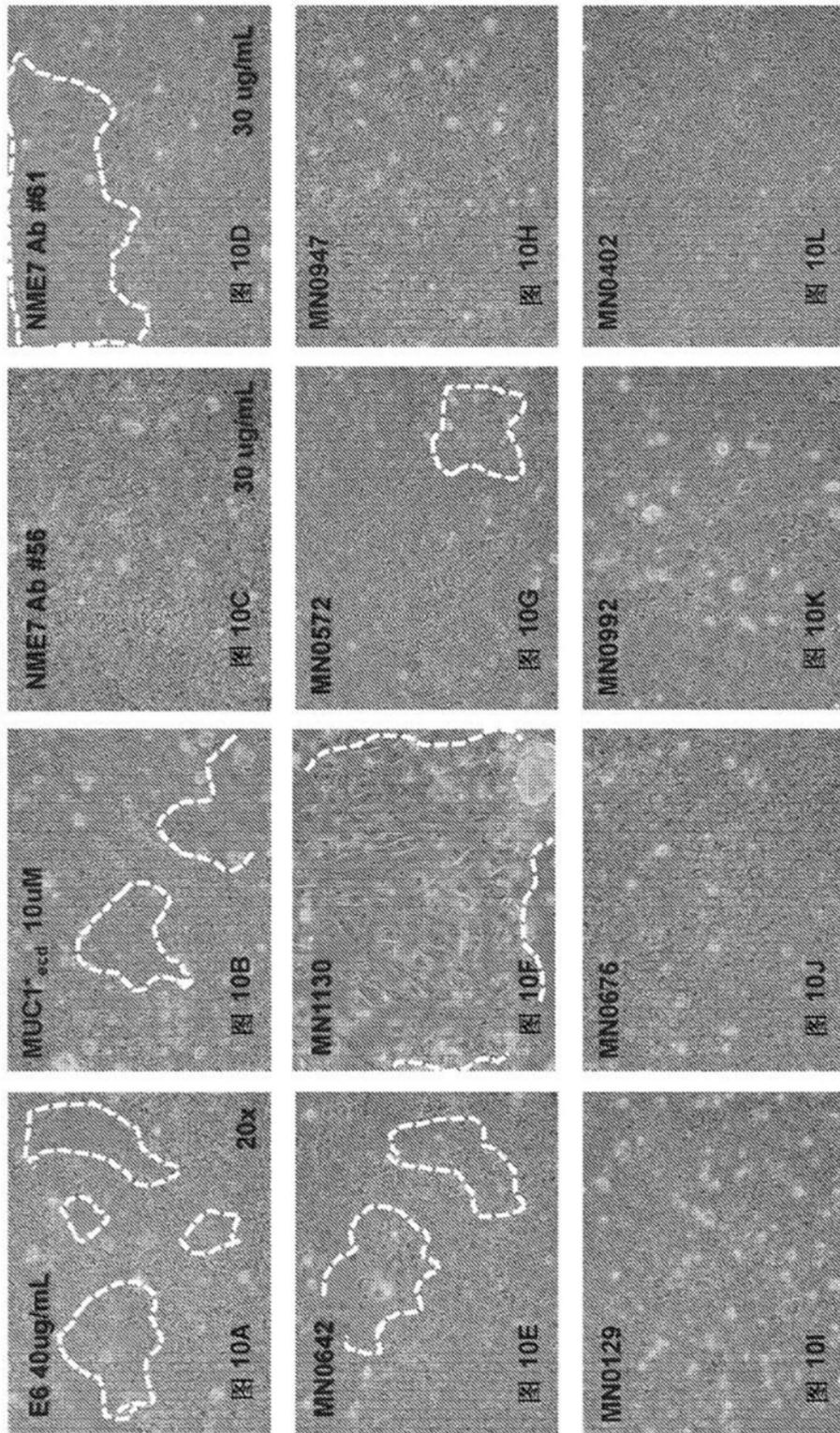
所有化合物以6 μM存在于0.2%DMSO中

幼稚状态干细胞：人ES细胞在NME7-AB中、抗-MUC1* (MN-C3) 上生长96h
测试期间未将NME7-AB添加到培养基中，放大10倍



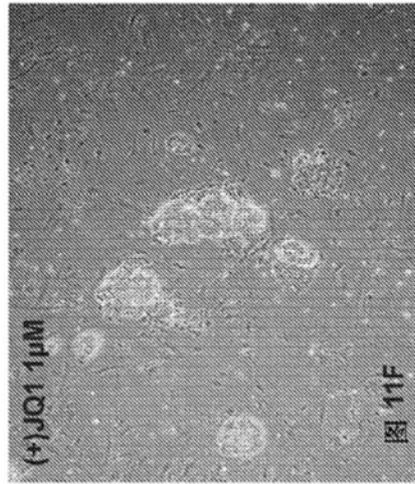
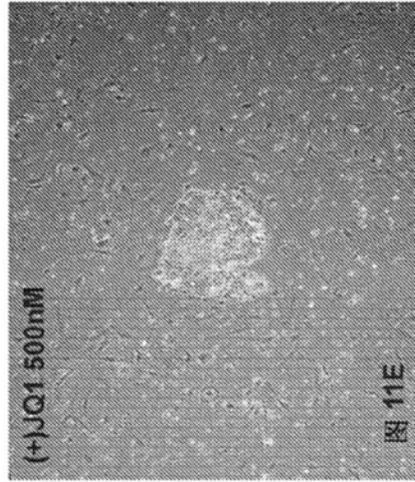
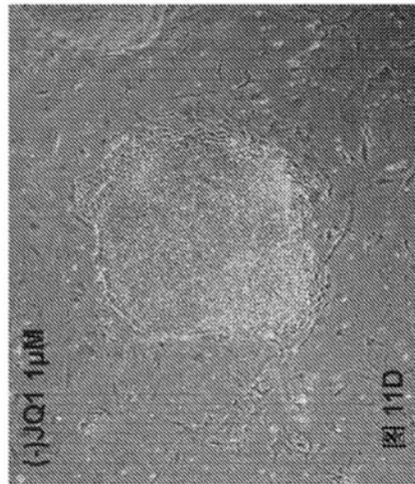
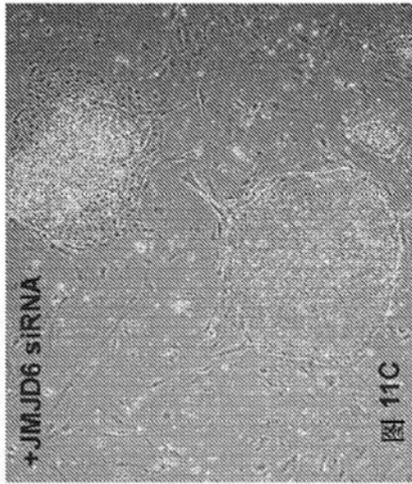
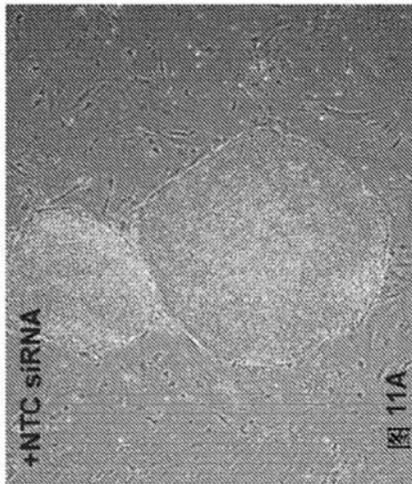
所有化合物以6 μM存在于0.2%DMSO中

幼稚状态干细胞：人ES细胞在NME7-AB中、抗-MUC1* (MN-C3) 上生长96h
测试期间未将NME7-AB添加到培养基中，放大20倍

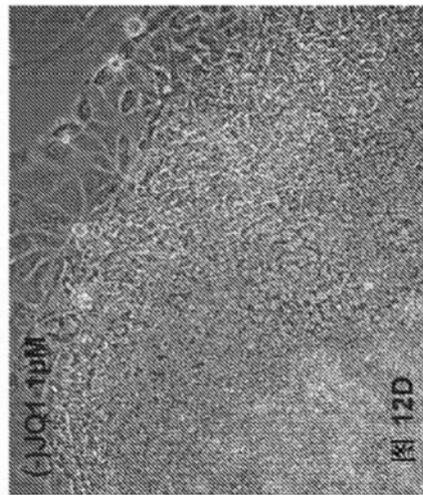
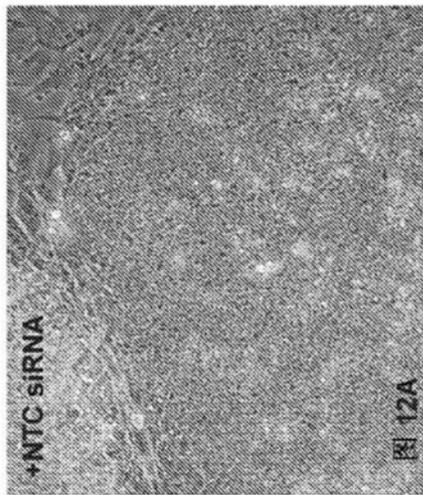
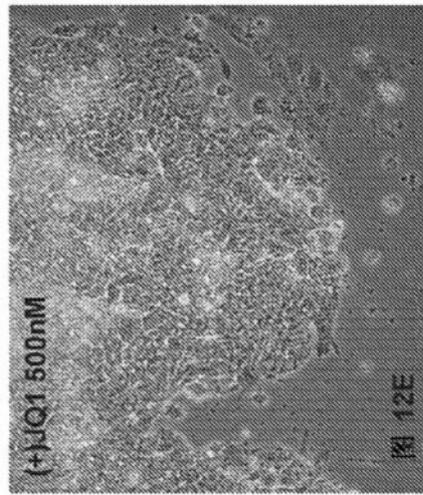
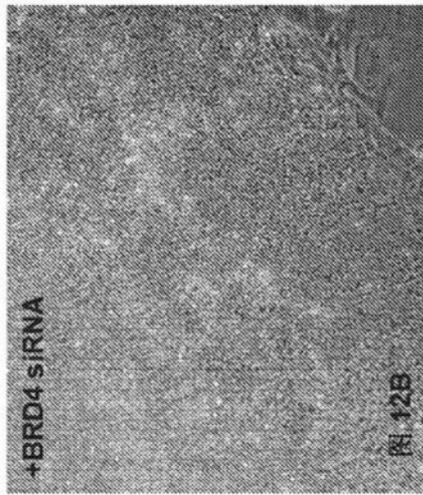
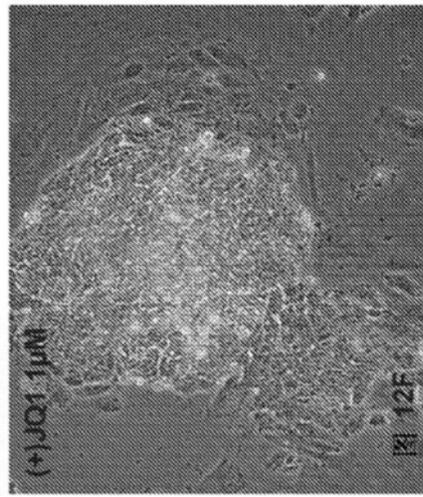
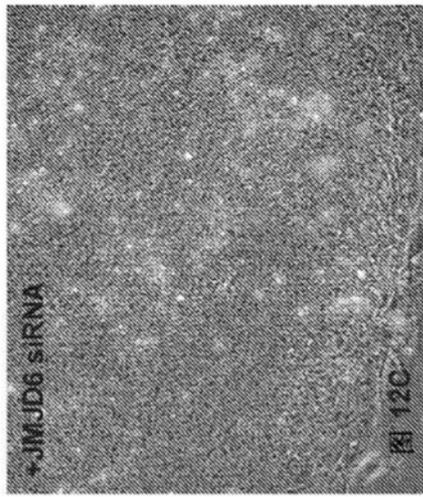


所有化合物以6 μM存在于0.2%DMSO中

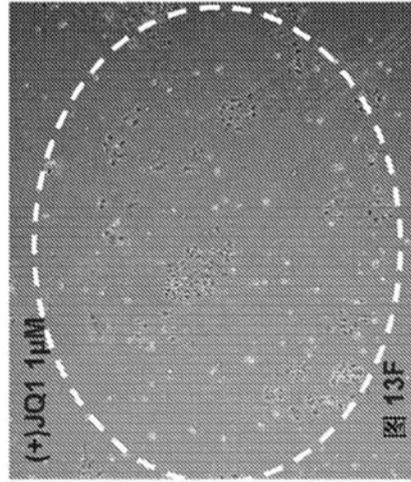
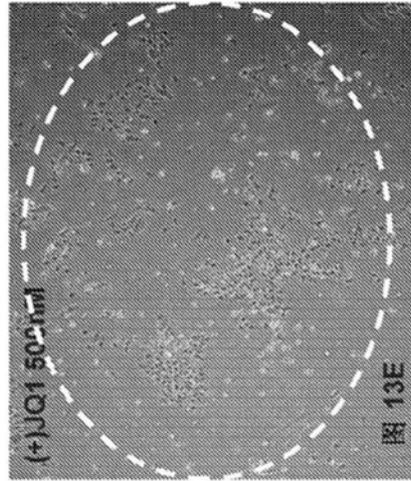
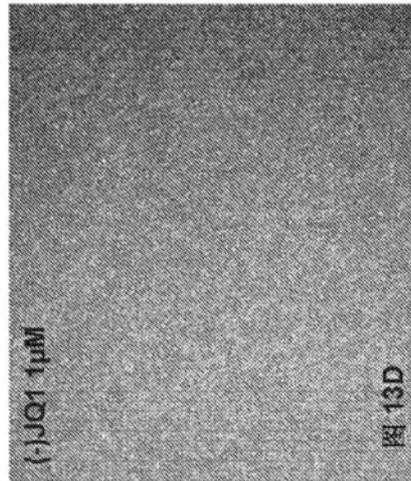
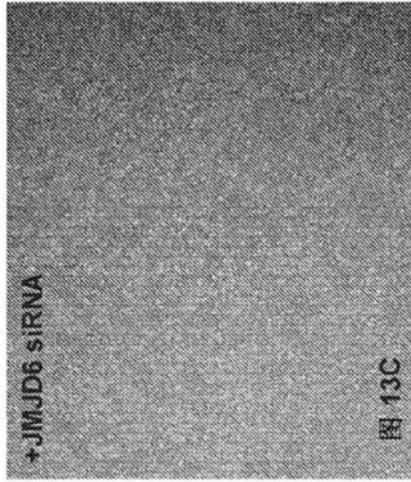
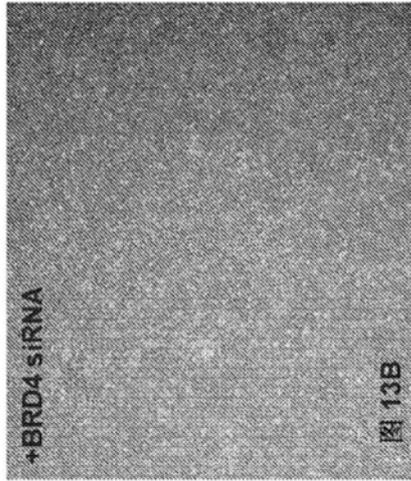
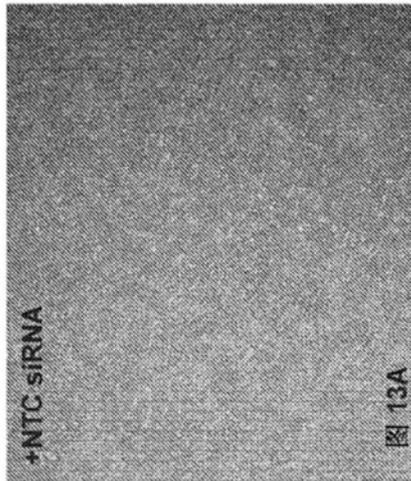
始发状态干细胞：人iPS细胞在bFGF中、MEF上生长96h
测试期间没有bFGF添加到培养基中，放大4倍



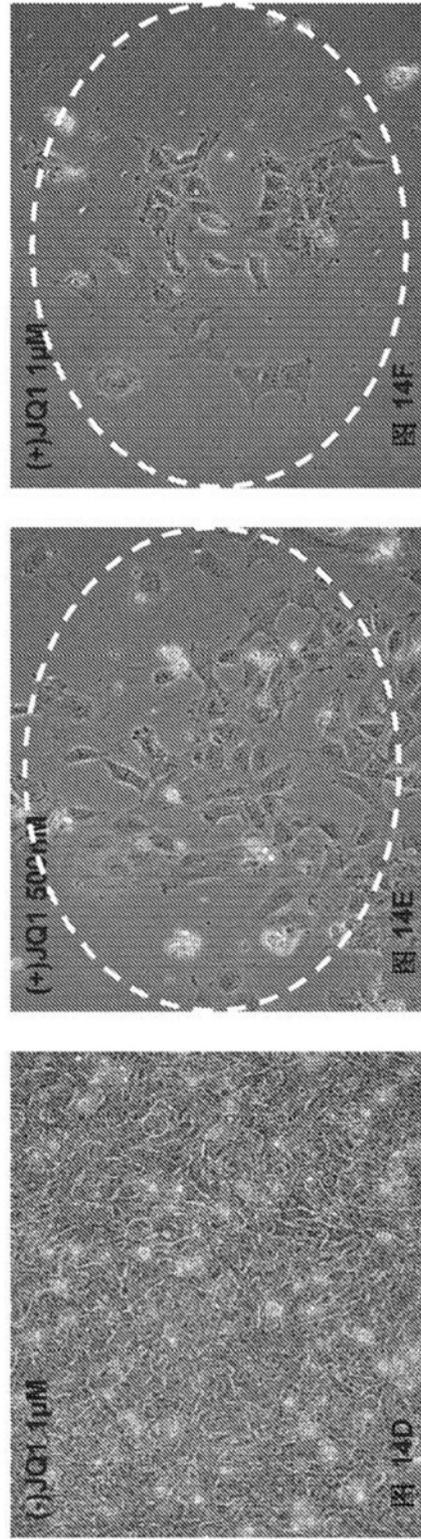
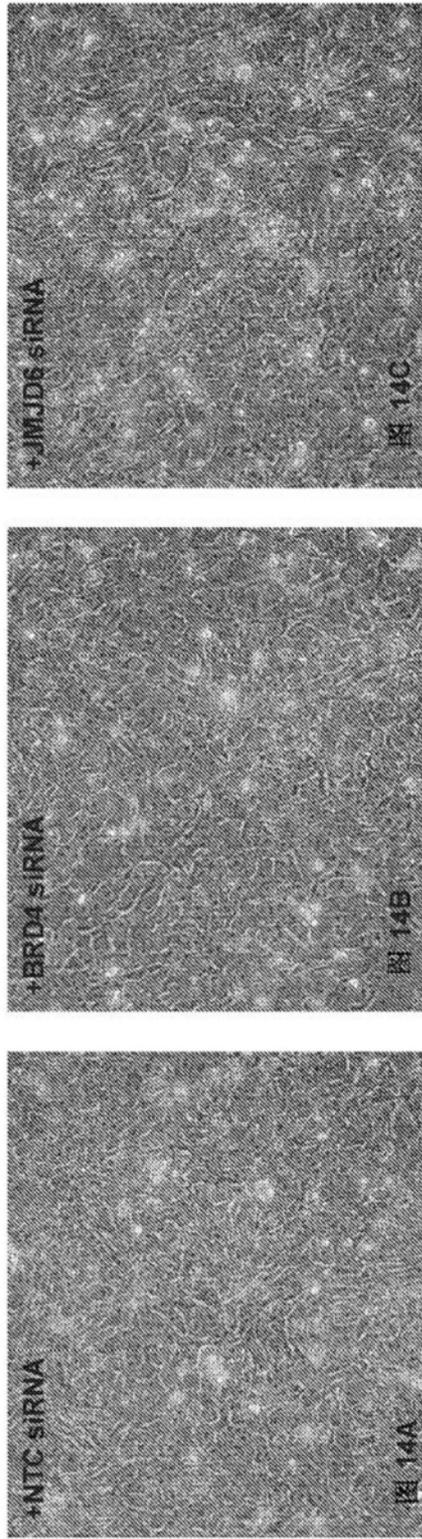
始发状态干细胞：人iPS细胞在bFGF中、MEF上生长96h
测试期间没有bFGF添加到培养基中，放大20倍



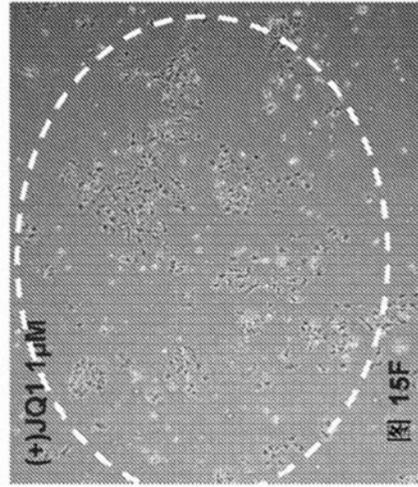
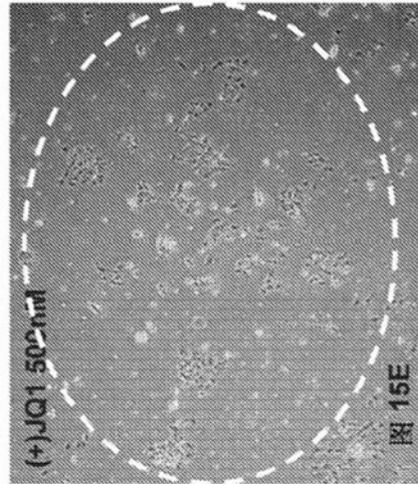
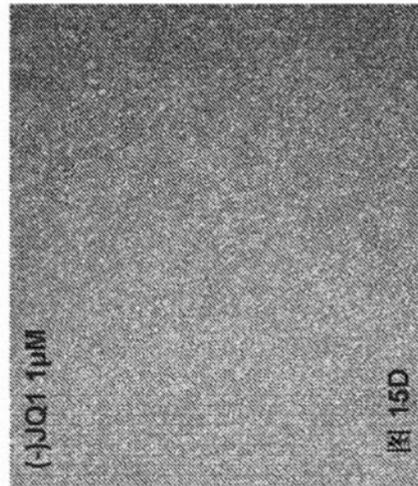
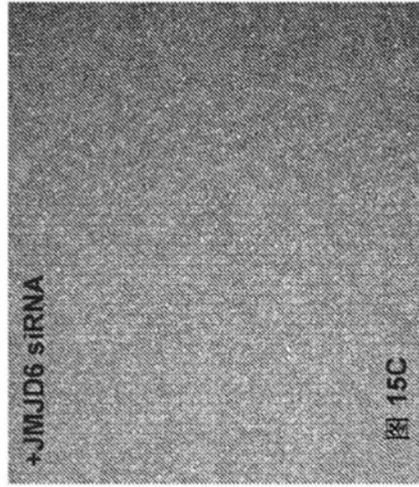
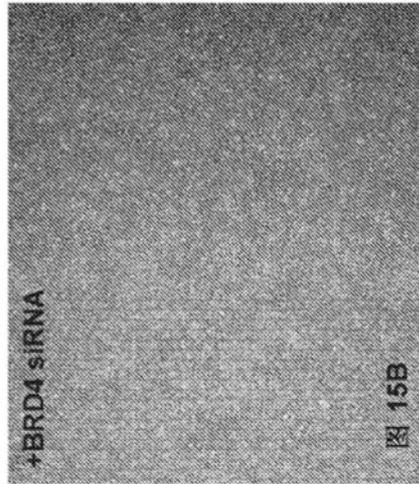
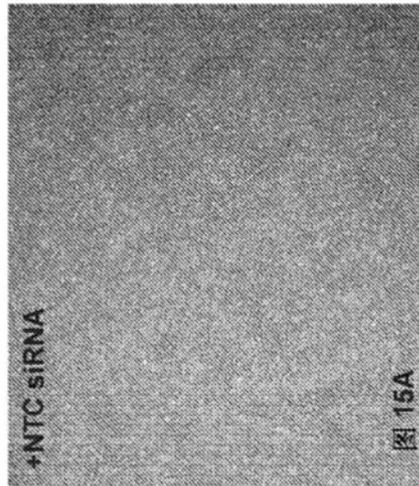
幼稚状态干细胞：人iPS细胞在NME7-AB中、抗-MUC1* (MN-C3) 上生长96h
测试期间没有NME7-AB添加到培养基中，放大4倍



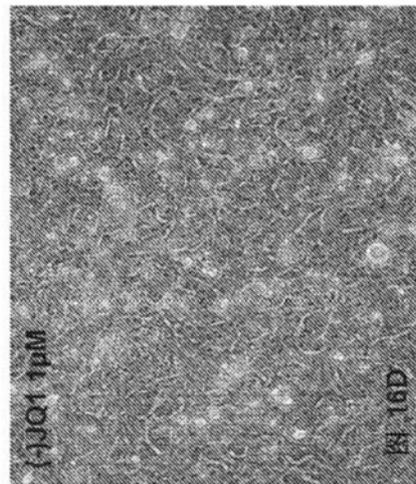
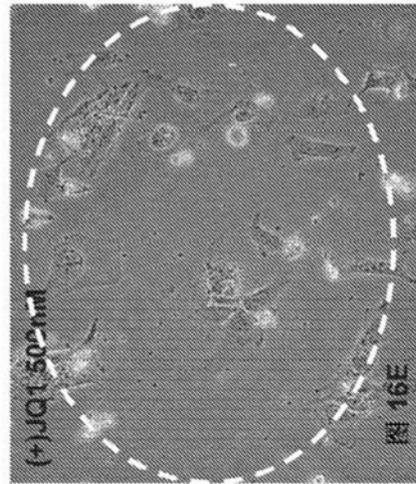
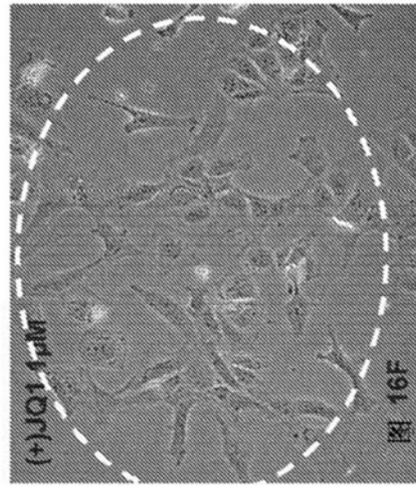
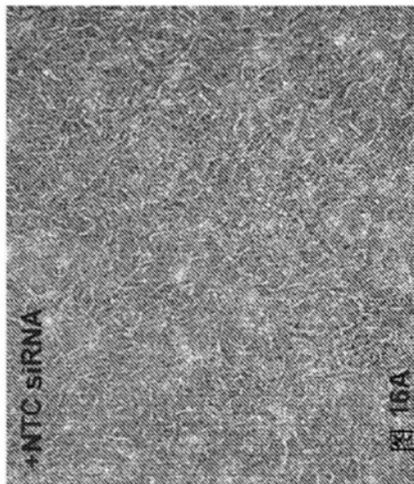
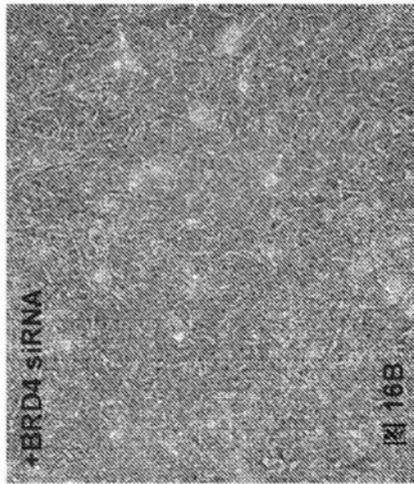
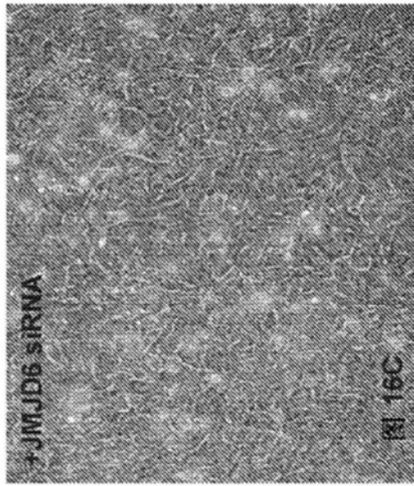
幼稚状态干细胞：人iPS细胞在NME7-AB中、抗-MUC1* (MN-C3) 上生长96h
测试期间没有NME7-AB添加到培养基中，放大20倍



幼稚状态干细胞：人iPS细胞在NME1二聚体中、抗-MUC1* (MN-C3) 上生长
测试期间没有NME1添加到培养基中，放大4倍，96h



幼稚状态干细胞：人iPS细胞在NME1二聚体中、抗-MUC1* (MN-C3) 上生长
测试期间没有NME1添加到培养基中，放大20倍，96h



参考化合物:

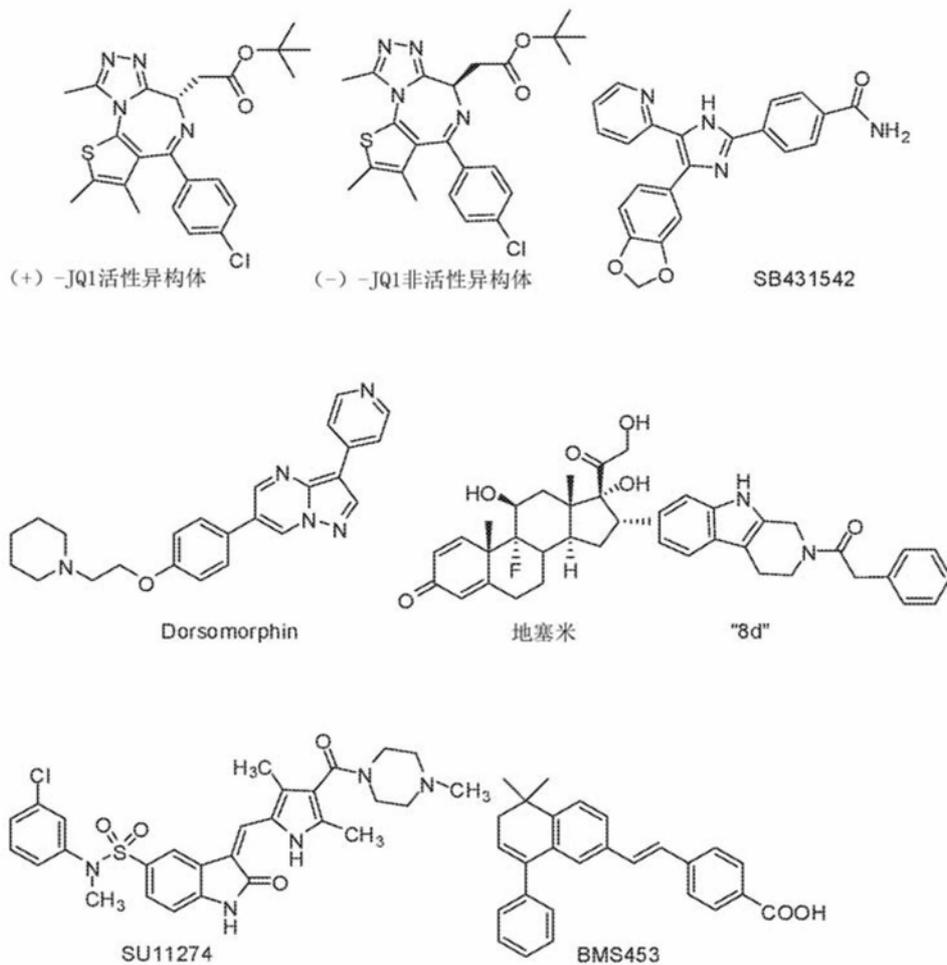


图17

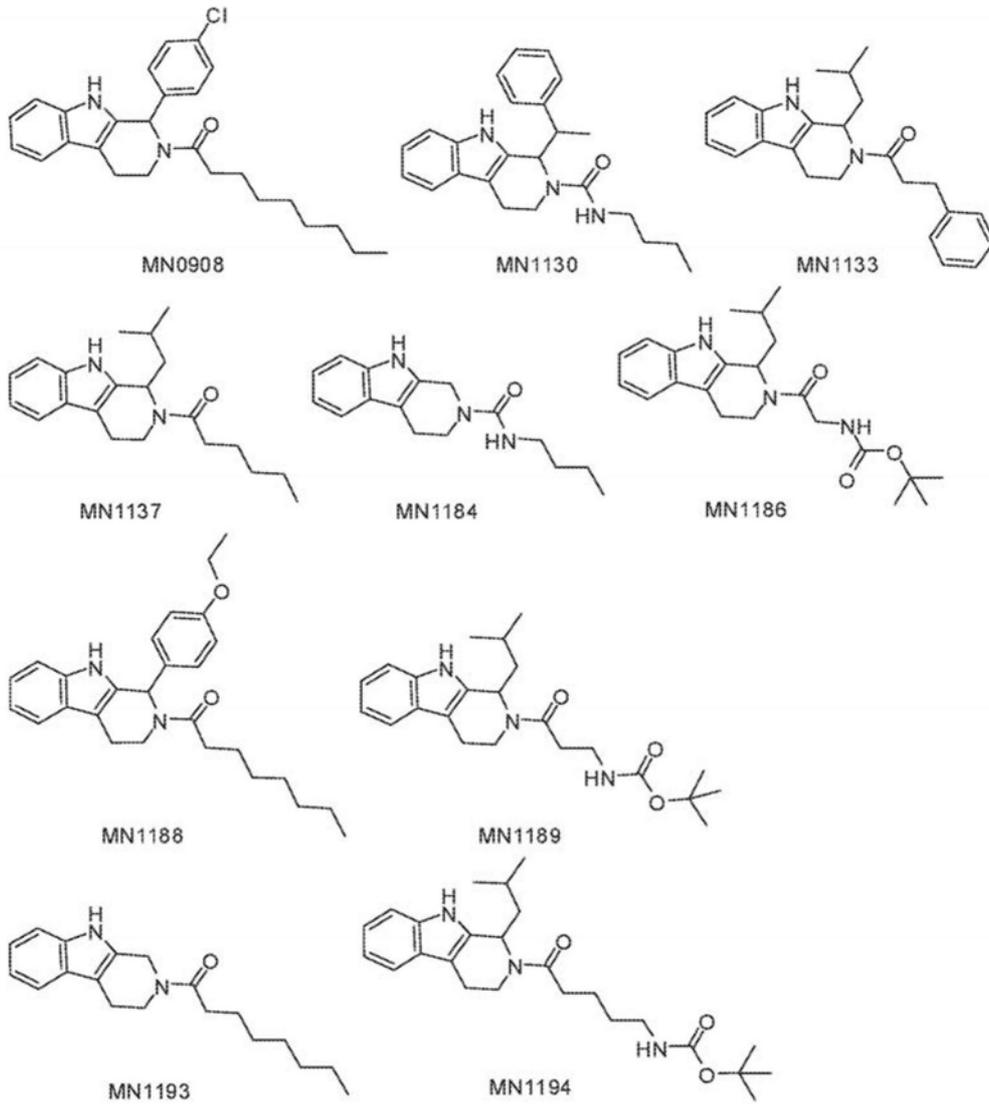


图17(续)

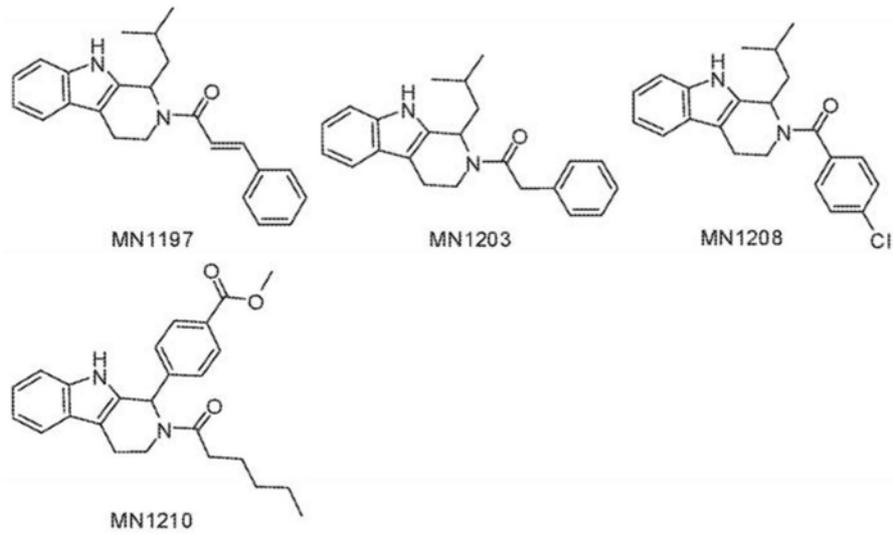


图17(续)

密涅瓦 (Minerva) 化合物编号		抑制癌 细胞迁移 @6 μ M	癌细胞 迁移IC50 (μ M)	增殖IC50	抑制癌 细胞增殖 @6 μ m	幼稚状 态干细 胞得分 @6 μ m	始发状 态干细 胞得分 @6 μ m	成纤维祖 细胞得分 @6 μ m
-	SU11274	69%	2.62		1	1	0	2
MN1173	(+)-JQ1	0%			4	4	2	2
MN1174	(-)-JQ1	10%			0	1	1	0
MN1175	SB431542	3%			0	2	1	-
MN1176	SU5402	0%			1	4	2	-
MN1177	dorsomorphin	31%			1	1	0	-
MN1204	"8d"	50%	14.86		-	0	0	-
MN1205	地塞米松	34%			-	1	1	-
MN1215	BMS453	7%			-	0	0	-
MN0642		11%			3	3	0	-
MN1130		10%	13.42		1	4	1	0
MN1292		50%	5.84	8.75	3	4	0	0
MN1293		59%	0.88	15.7	1	3	0	0
MN1294		31%	-		1	3	2	0
MN1305		51%	5.98		1	0	1	0
MN1306		69%	3.09		2	0	0	0
MN1307		72%	2.54		3	0	0	0
MN1308		17%	9.7		1	0	0	0
MN1309		6%	-		1	0	0	0
MN1310		24%	7.5		3	0	0	0
MN1311		24%	6.2		4	0	0	0
MN1312		8%	-		0	0	0	0
MN1317		43%	17.7		2	2	0	1
MN1318		52%	2.8		0	3	1	1
MN1319		66%	2.8		1	3	1	1
MN1320		49%	6		2	0	0	0
MN1321		69%	0.663	1.59	2	4	2	0
MN1322		51%	27		1	3	1	0
MN1329		6%	12		0	0	2	0
MN1330		55%	0.74		2	4	1	0
MN1331		59%	1.2		1	4	3	0
MN1332		73%	0.256		1	4	0	0
MN1333		76%	0.99		1	4	1	0

图18A

密涅瓦 (Minerva) 化合物编号	抑制癌 细胞迁移 @6 μ M	癌细胞 迁移IC50 (μ M)	增殖IC50	抑制癌 细胞增殖 @6 μ m	幼稚 状态干 细胞得 分 @6 μ m	始发状 态干细胞 得分 @6 μ m	成纤维祖 细胞得分 @6 μ m
MN1334	69%	0.4		2	3	0	0
MN1335	72%	0.246		1	4	2	0
MN1336	69%	1.089		1	4	3	1
MN1337	72%	0.529		1	4	2	0
MN1338	71%	1.031		1	4	3	0
MN1339	66%	0.22		1	4	0	0
MN1340	66%	0.15		2	4	0	0
MN1341	68%	0.113	2.77	2	3	3	0
MN1351	2%	12		0	0	0	0
MN1352	65%	0.13	3.44	4	4	0	0
MN1353	60%	0.341		4	2	1	0
MN1354	66%	1.16		2	4	0	1
MN1355	66%	0.033	4.29	4	4	0	0
MN1356	58%	0.85		3	4	2	0
MN1357	62%	0.243		3	4	3	0
MN1358	64%	0.399		2	4	0	0
MN1359	61%	1.24		2	4	0	0
MN1360	55%	1.038		3	3	1	0
MN1362	69%	0.014		2	3	0	0
MN1363	66%	1.28		2-3	2	0	0
MN1369	70%	0.653		2-3	3	0	0
MN1370	0%	12		0	0	0	0
MN1371	0%	12		0	2	0	0
MN1372	0%	12		0	1	0	0
MN1377	80%	0.501	2.73	3	3	1	0
MN1378	82%	0.126	2.5	4	1	0	0
MN1379	80%	0.176	3.86	4	3	2	1
MN1380	82%	0.32	3.74	4	3	0	0
MN1381	75%	0.142	3.06	4	1	0	0
MN1382	89%	0.154	3.6	4	2	0	0
MN1383	68%	1.27	3.61	4	3	0	0
MN1384	86%	0.211	2.99	4	4	0	0
MN1385	70%	0.214	2.76	4	3	0	0

图18B

密涅瓦 (Minerva) 化合物编号	抑制癌 细胞迁移 @6 μ M	癌细胞 迁移IC50 (μ M)	增殖IC50	抑制癌 细胞增殖 @6 μ m	幼稚状 态干细 胞得分 @6 μ m	始发状 态干细 胞得分 @6 μ m	成纤维祖 细胞得分 @6 μ m
MN1386	86%	0.287	3.79	4	3	0	0
MN1387	83%	1.083	8.63	3	2	0	0
MN1388	81%	1.004	12	2	2	0	0
MN1389	92%	0.096	6.75	3	2	0	0
MN1390	74%	1.432	7.44	3	3	0	0
MN1391	88%	0.159	12	2	1	0	0
MN1392	88%	0.057	5.59	2	1	0	0
MN1393	82%	1.885	12	2	2	0	0
MN1394	85%	0.057	6.86	2	4	0	0
MN1395	86%	0.679	7.13	2	0	0	0
MN1396	43%	-	14.4	1	4	0	0
MN1397	45%	10.4	11.2	1	4	4	0
MN1398	42%	10.3	13.1	1	4	4	0
MN1399	50%	-	7.3	2	1	0	0
MN1400	43%	-	12	1	0	0	0
MN1401	75%	0.556	12	0	0	0	0
MN1402	71%	1.601	6.81	3	2	0	0
MN1403	82%	0.027	3.34	3	4	0	0
MN1409	77%	0.014	5.17	3	3	0	0
MN1410	78%	0.261	2.37	3	2	0	0
MN1411	75%	0.799	12	1	0	0	0
MN1412	81%	1	4.73	2	2	2	0
MN1413	83%	0.01	8	2	4	0	0
MN1414	81%	0.018	12.2	2	4	0	0
MN1415	75%	5.2	21.3	1	0	0	0
MN1419	82%	0.164		0	2	0	0
MN1420	84%	0.029		3	4	0	0
MN1422	84%	0.100		2	4	0	0
MN1423	84%	0.012		2	4	0	0
MN1424	79%	0.046		1	4	0	0
MN1425	80%	1.28		N/A	4	0	0
MN1426	80%	0.889		N/A	4	0	0
MN1427	80%	0.076	0.272	2	3	0	0

图18C

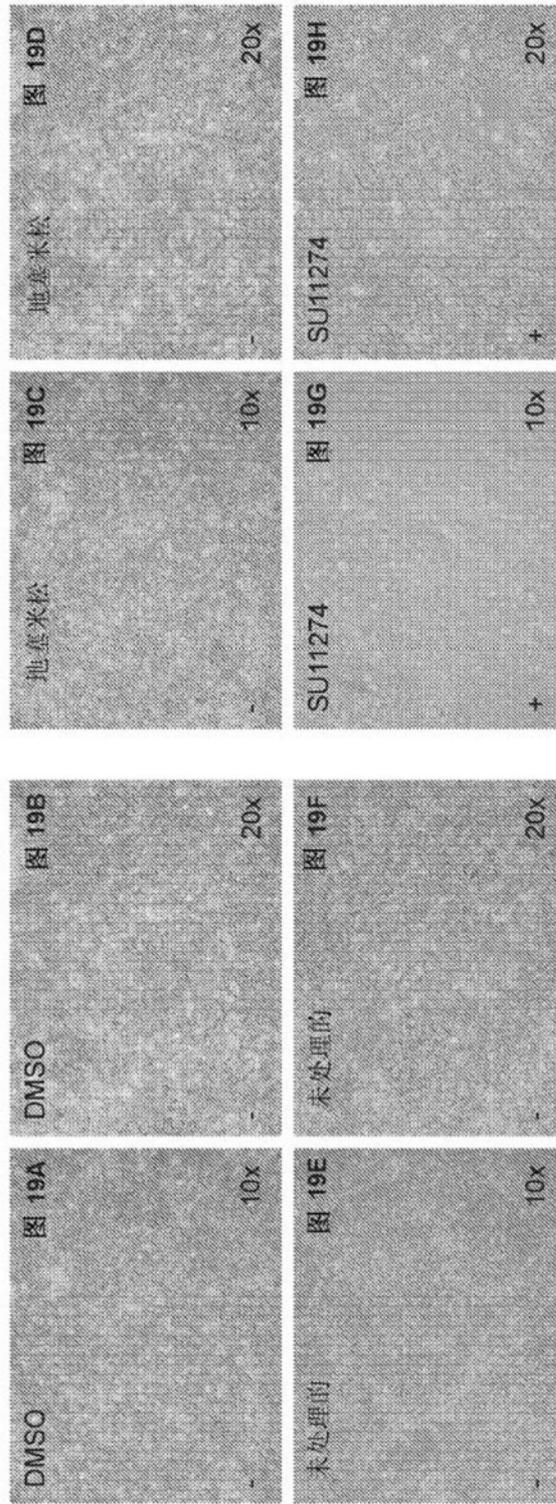
密涅瓦 (Minerva) 化合物编号	抑制癌 细胞迁移 @6 μ M	癌细胞 迁移IC50 (μ M)	增殖IC50	抑制癌 细胞增殖 @6 μ m	幼稚状 态干细 胞得分 @6 μ m	始发状 态干细 胞得分 @6 μ m	成纤维祖 细胞得分 @6 μ m
MN1428	79%	0.007	18	0	4	0	0
MN1429	81%	0.873	24	2	0	0	0
MN1430	77%	0.244	2.7	2	0	0	0
MN1431	79%	0.098	2.8	2	3	0	0
MN1432	81%	0.485	2.7	2	3	0	0
MN1433	82%	1.037	0.5	2	4	0	0
MN1434	84%	0.014	24	2	4	0	0
MN1435	45%	-		N/A	1	0	0
MN1436	81%	2.55		N/A	3	0	0
MN1437	78%	0.113		N/A	1	0	0
MN1438	76%	0.091		N/A	4	0	0
MN1439	40%	23.47		N/A	0	0	0
MN1440	56%	6.78		N/A	4	0	0
MN1441	90%	0.028		N/A	1	0	0
MN1442	80%	0.018		N/A	1	0	0
MN1443	80%	0.167		N/A	4	0	0
MN1444	77%	0.185		N/A	1	0	0
MN1445	74%	0.348		N/A	1	0	0
MN1447	77%	0.015		N/A	3	0	0
MN1448	78%	0.027		N/A	1	0	0
MN1449	76%	0.030		N/A	1	0	0
MN1450	80%	0.125		N/A	0	0	0
MN1451	85%	0.013		N/A	2	0	0
MN1452	89%	0.037		N/A	3	0	0
MN1453	91%	0.018		N/A	2	0	0
MN1454	91%	0.043		N/A	1	0	0
MN1455	77%	0.003		N/A	3	2	0
MN1456	90%	0.105		N/A	2	0	0
MN1457	86%	0.409		N/A	0	0	0
MN1458	65%	5.1		N/A	0	0	0
MN1459	55%	2.2		N/A	0	0	0
MN1460	65%	2.01		N/A	0	0	0
MN1461	81%	136		N/A	3	2	0

图18D

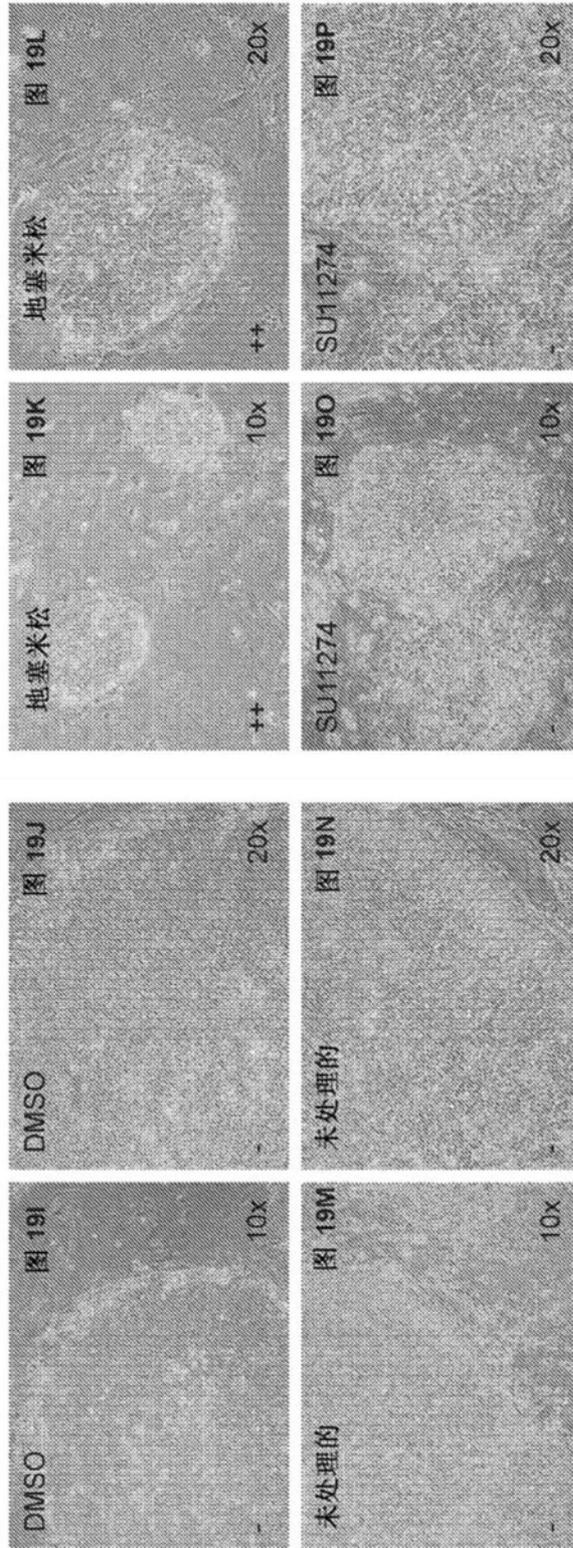
密涅瓦 (Minerva) 化合物编号	抑制癌 细胞迁移 @6 μ M	癌细胞 迁移IC50 (μ M)	增殖IC50	抑制癌 细胞增殖 @6 μ m	幼稚状 态干细 胞得分 @6 μ m	始发状 态干细 胞得分 @6 μ m	成纤维祖 细胞得分 @6 μ m
MN1462	85%	0.505		N/A	3	2	0
MN1463	88%	0.073		N/A	1	1	0
MN1464	88%	0.671		N/A	4	2	0
MN1465	89%	0.846		N/A	1	1	0
MN1466	91%	4.472		N/A	1	0	0
MN1467	80%	-		N/A	0	0	0
MN1468	69%	0.734		N/A	1	0	0
MN1469	80%	1		N/A	0	0	0
MN1470	69%	0.019		N/A	3	0	0
MN1471	73%	0.007		N/A	4	0	0
MN1291	-	-		1	1	3	0

图18E

幼稚干细胞



始发干细胞



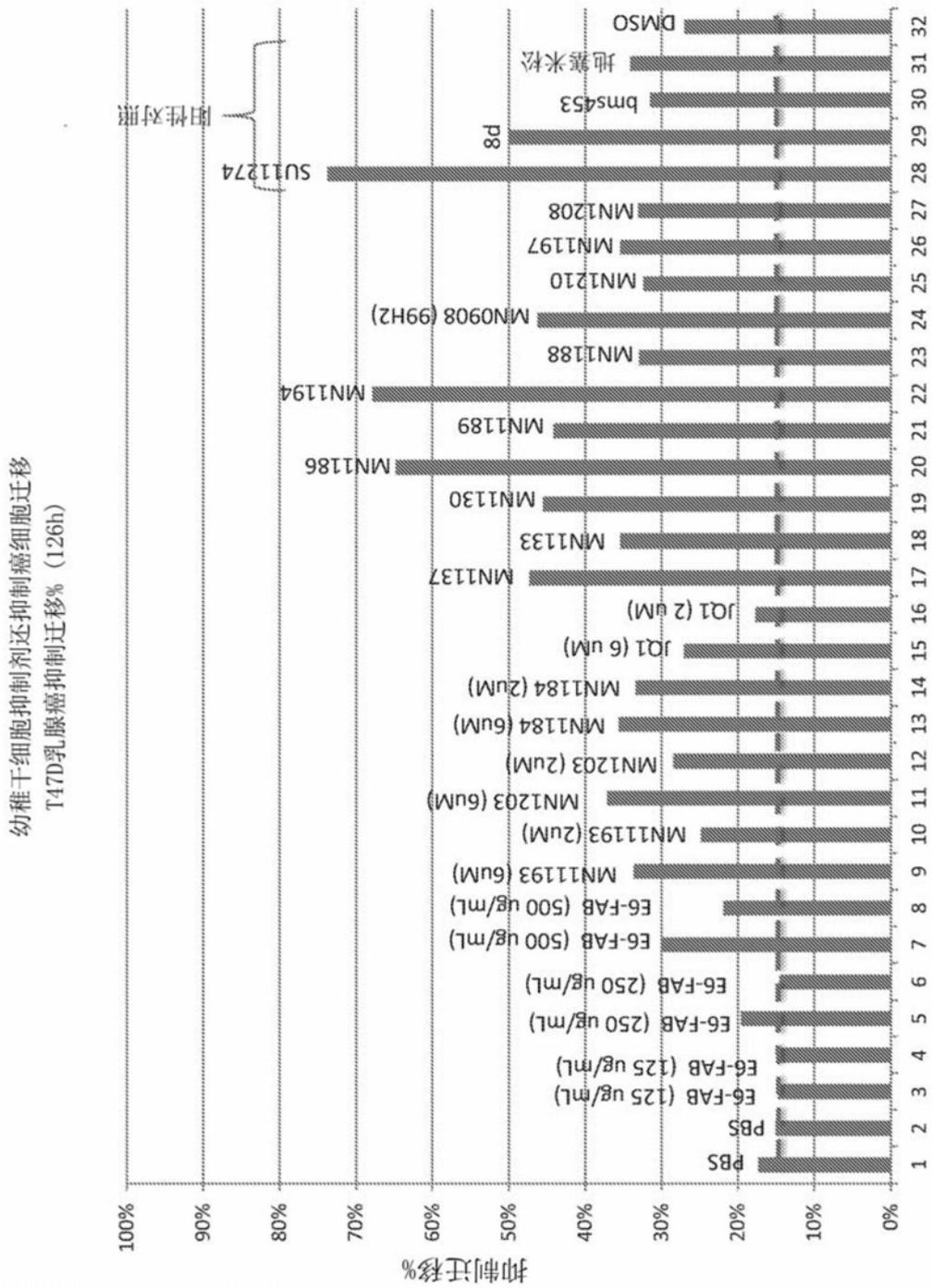


图20

测试干细胞抑制剂对癌细胞迁移的抑制作用 (T47D迁移@ 126h)

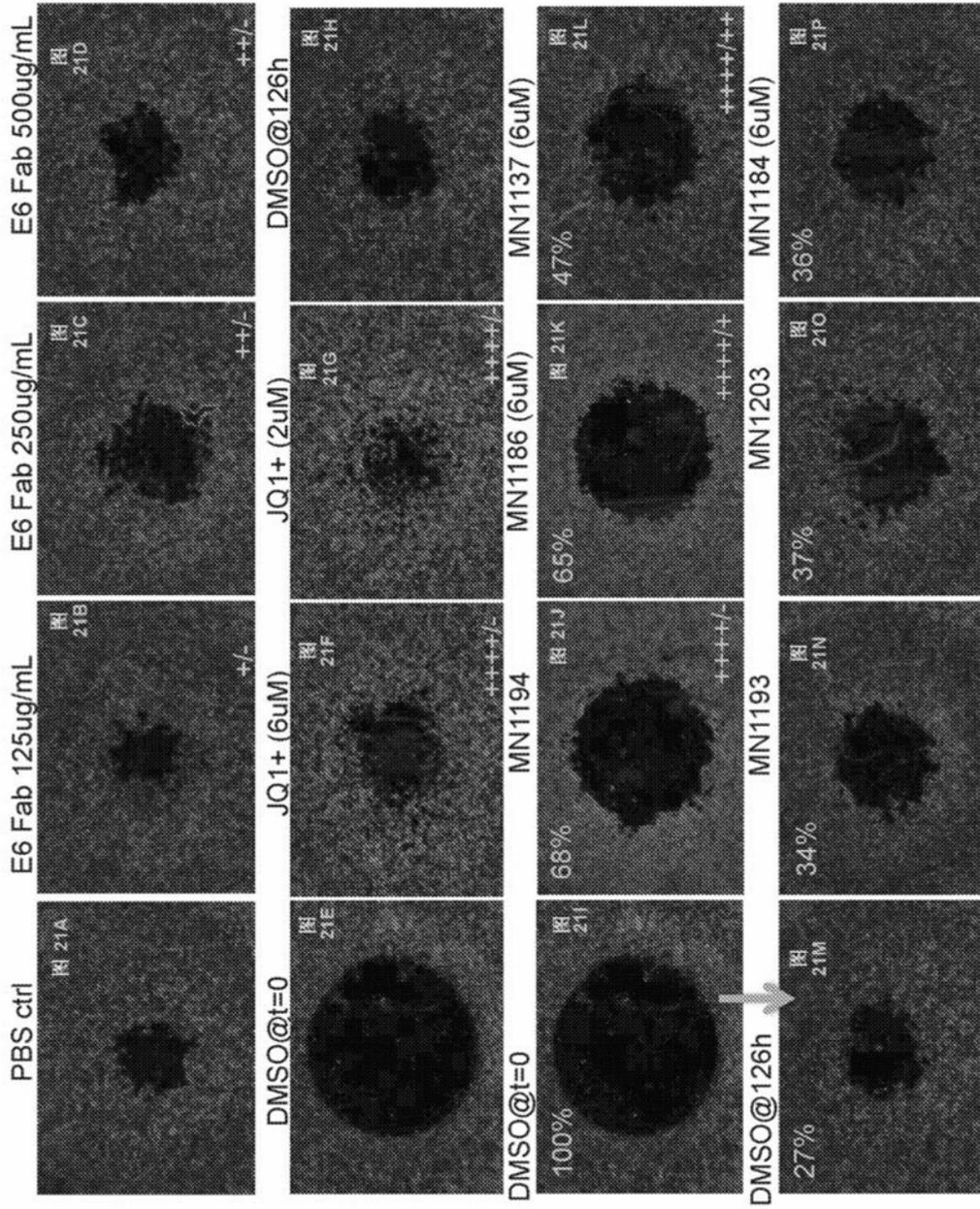


图21

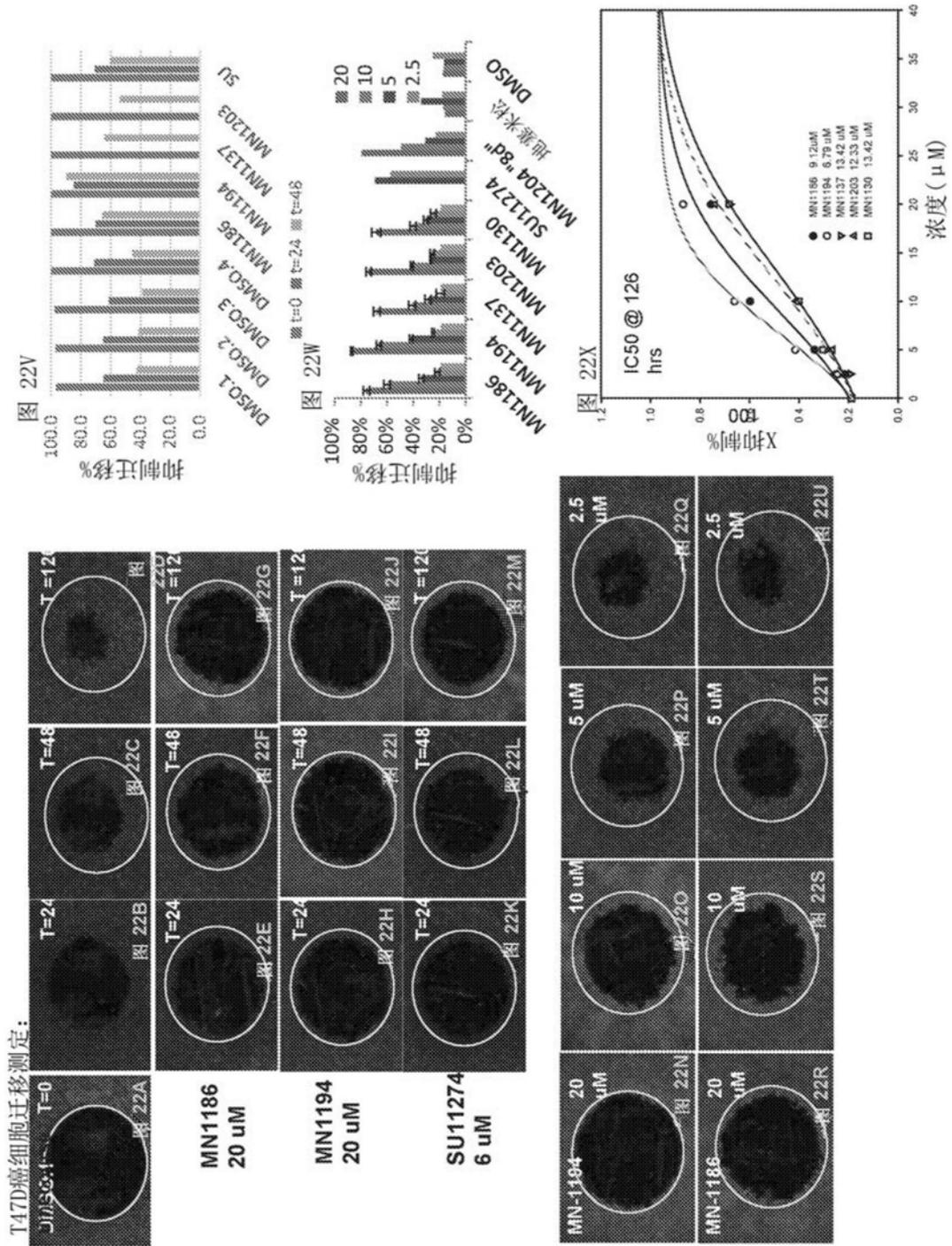
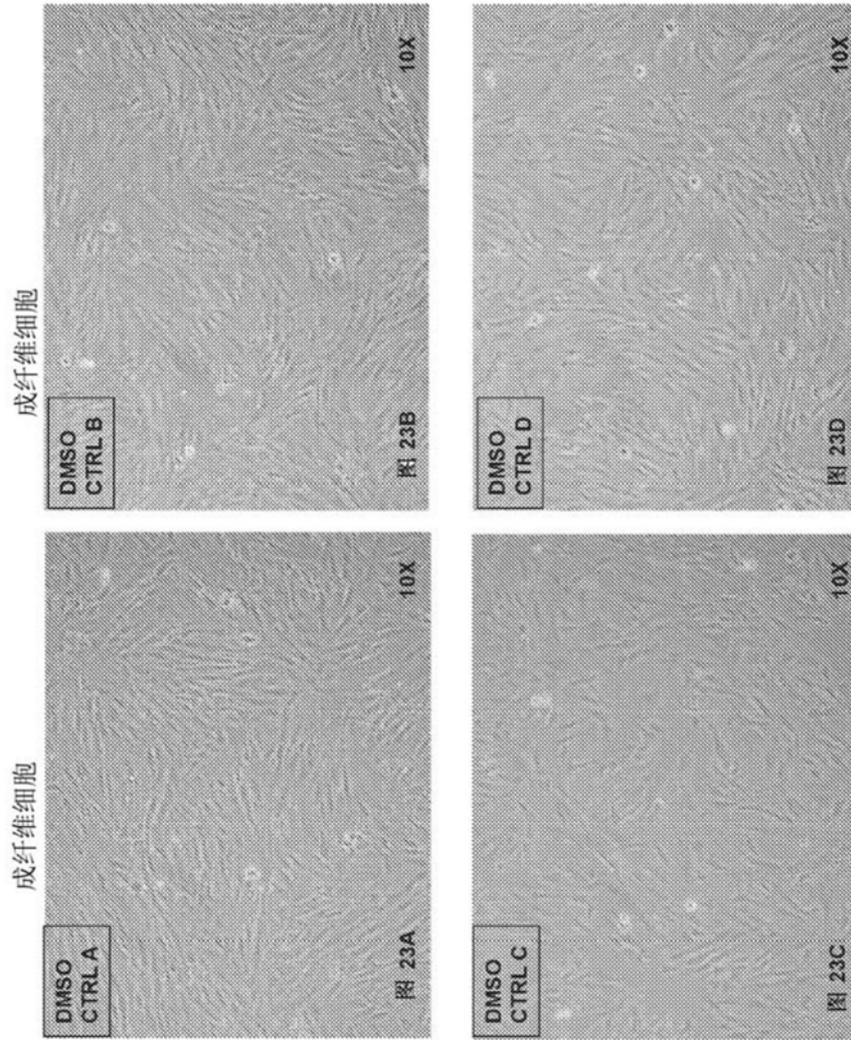
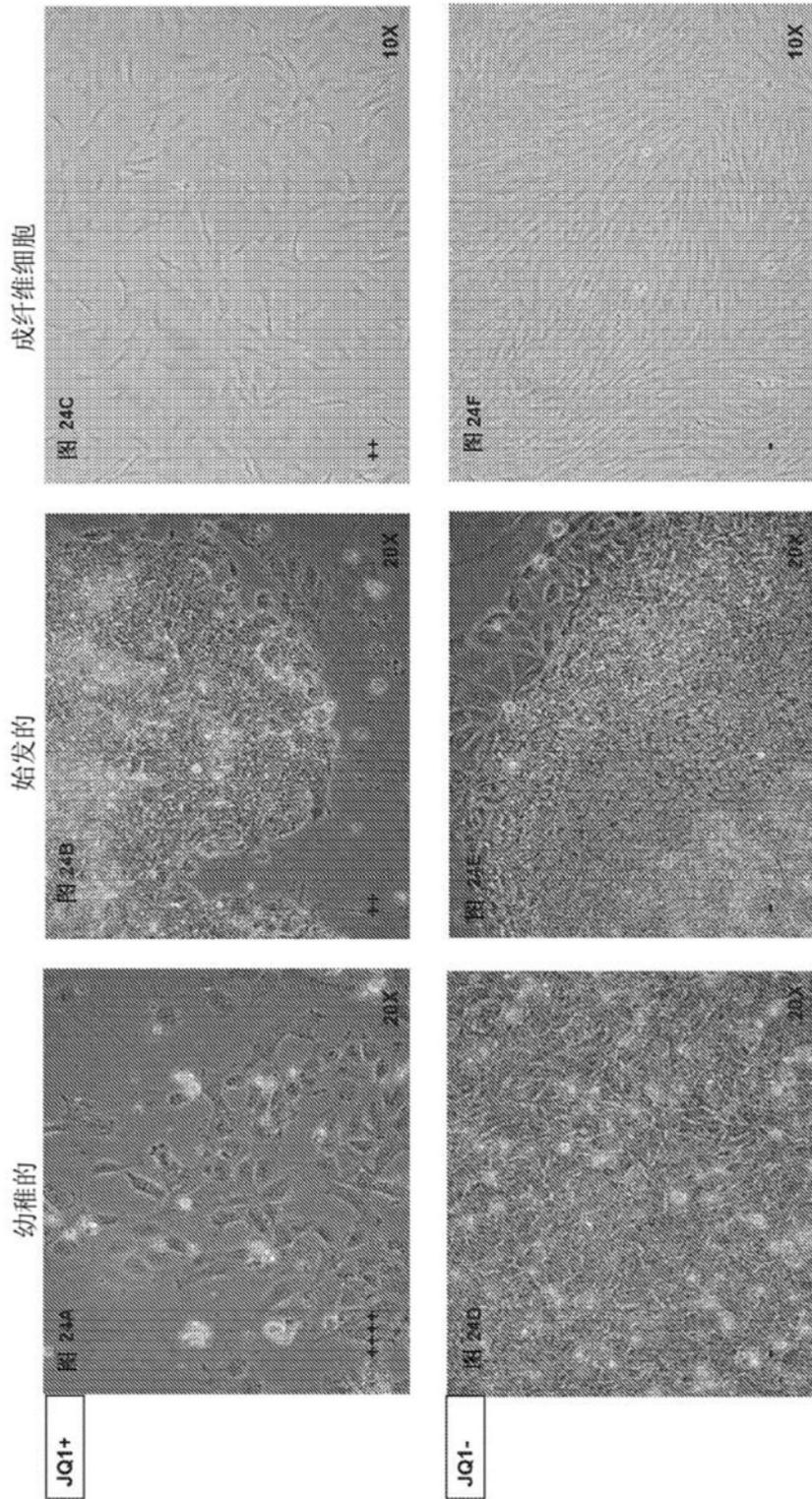
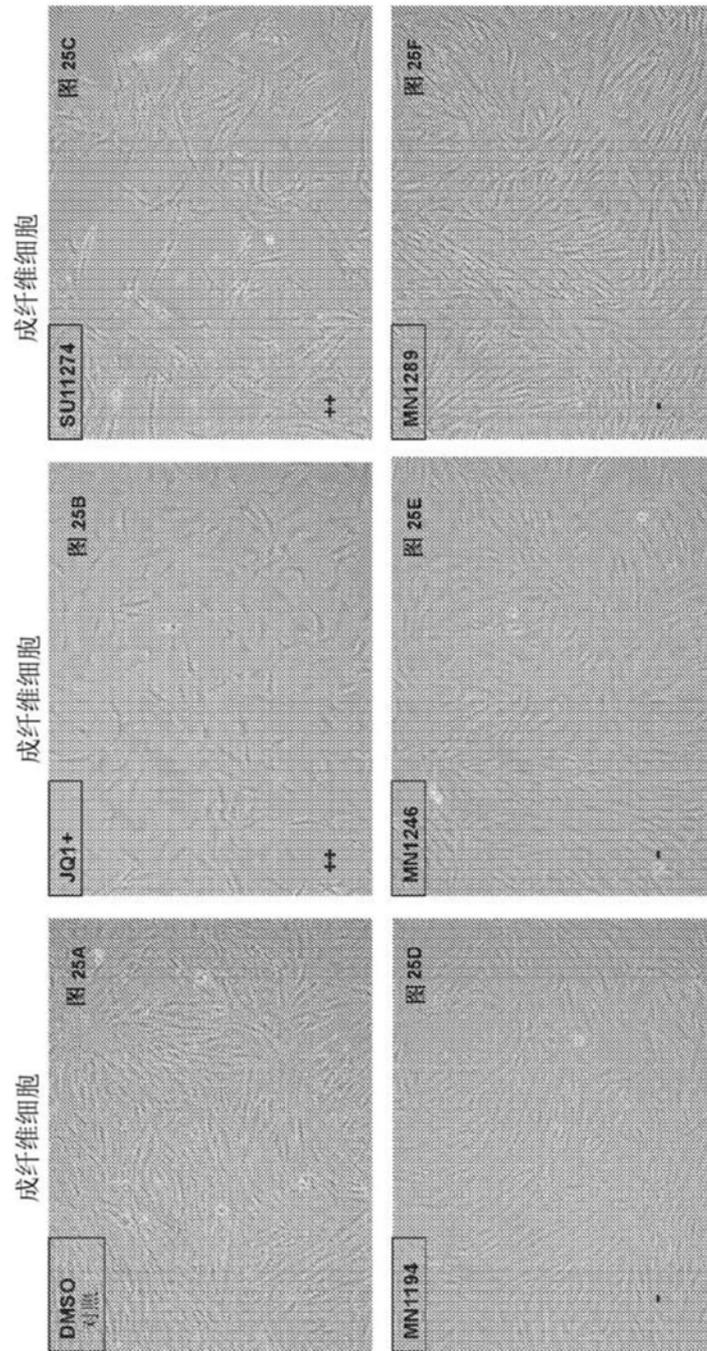


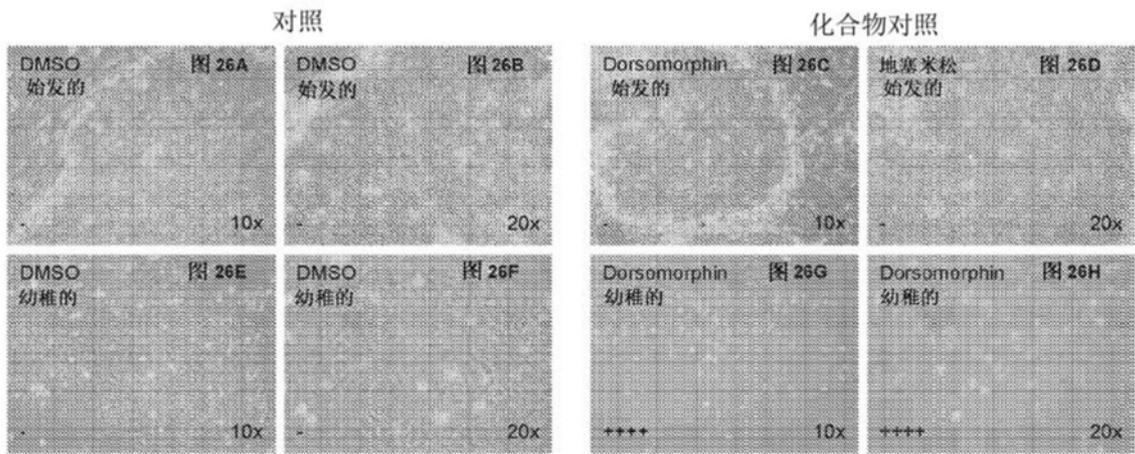
图22



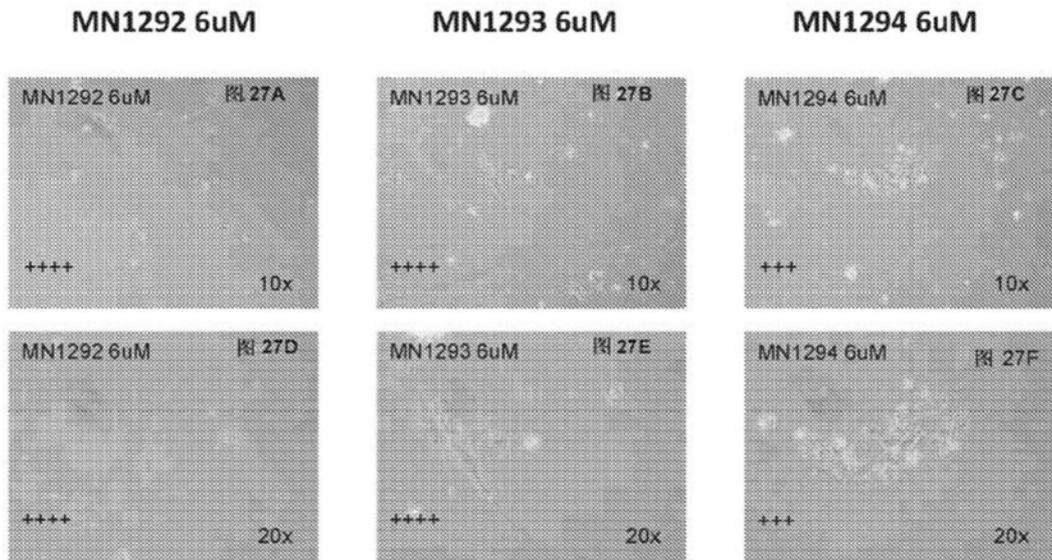




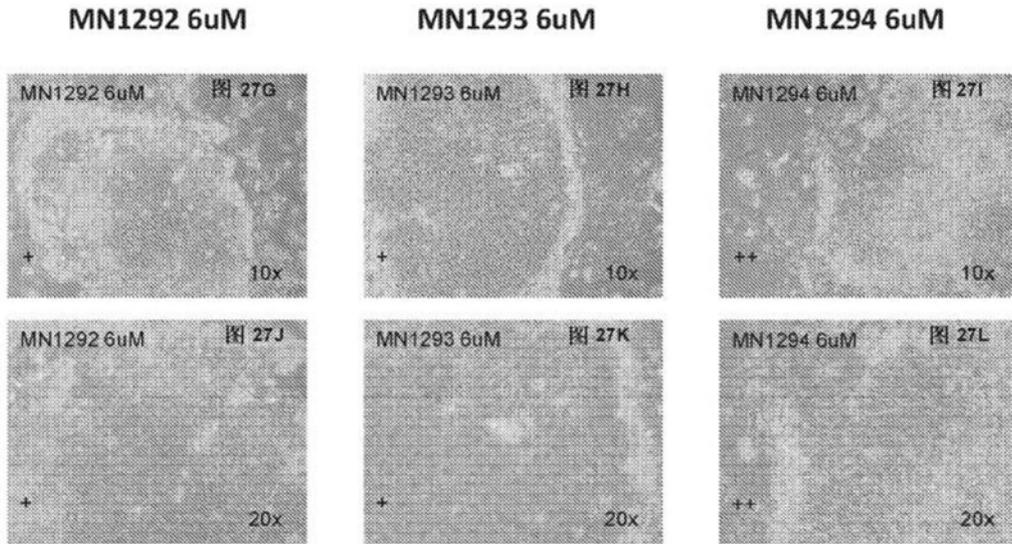
干细胞对照



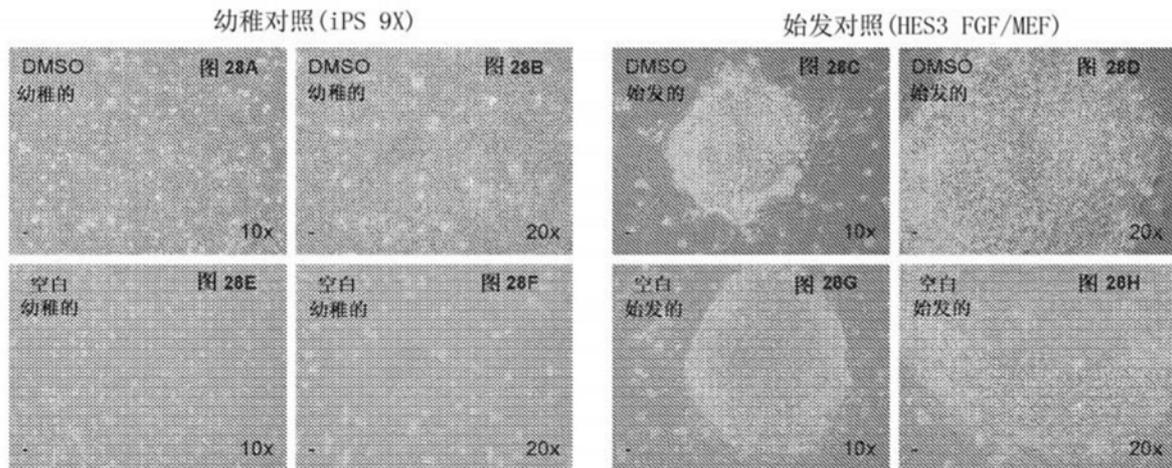
幼稚干细胞



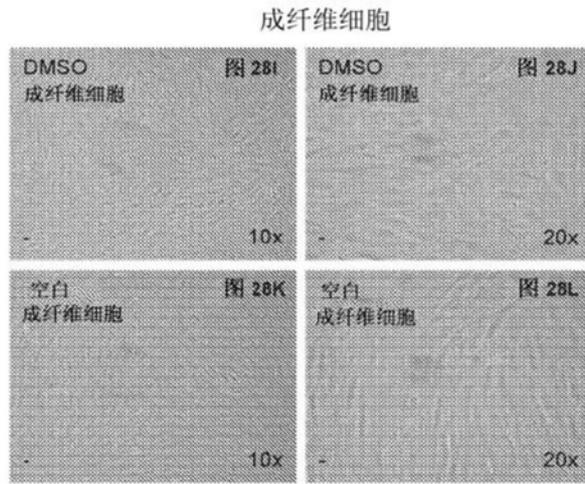
始发干细胞



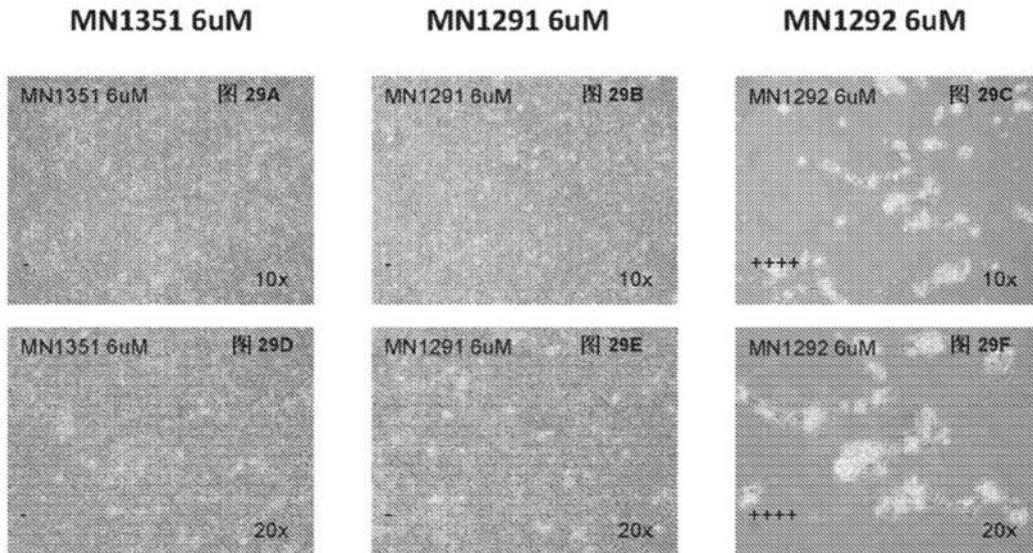
干细胞对照



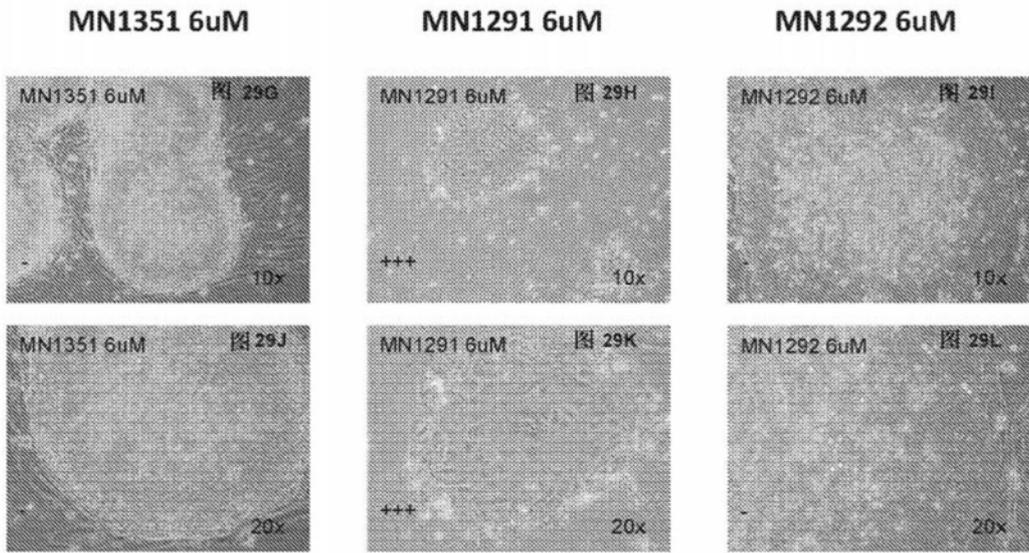
干细胞对照



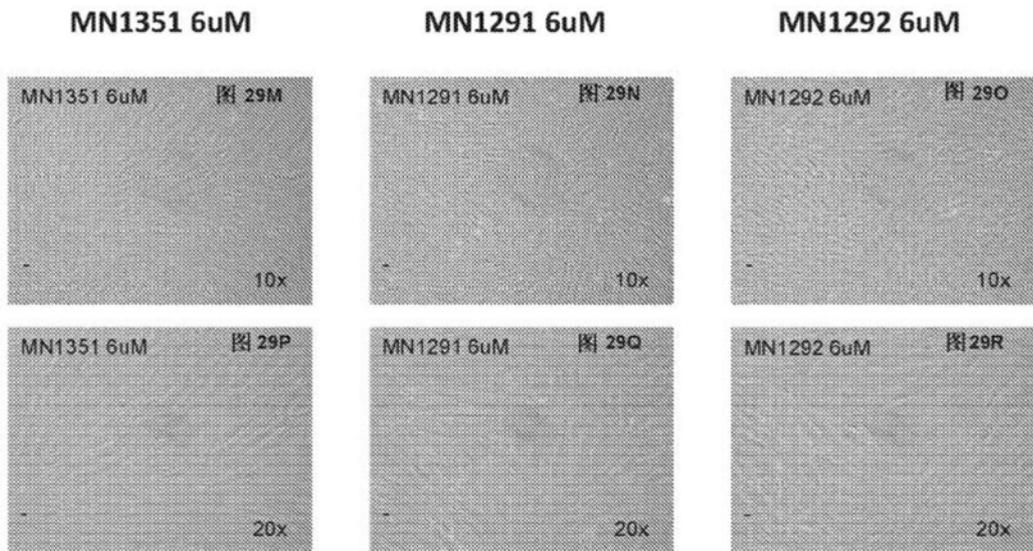
幼稚干细胞



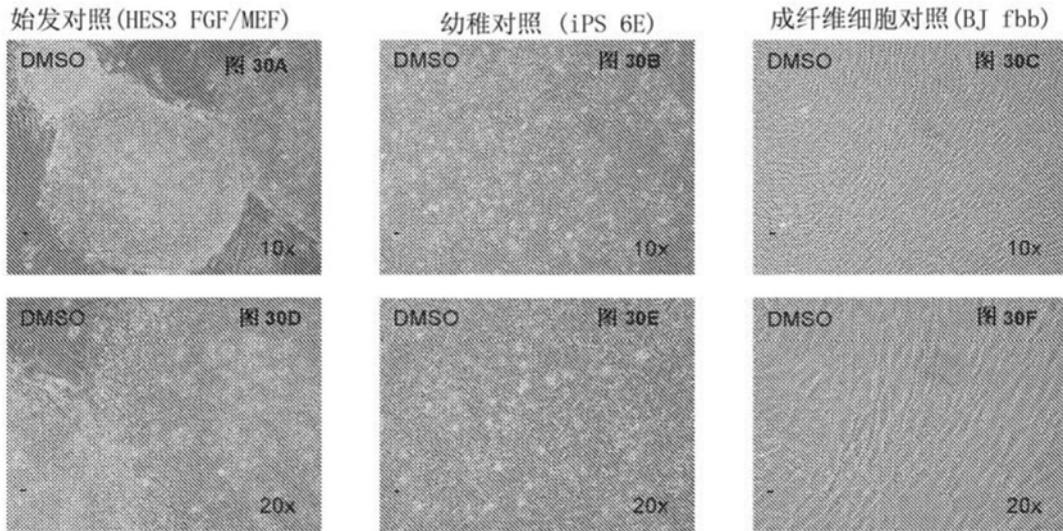
始发干细胞



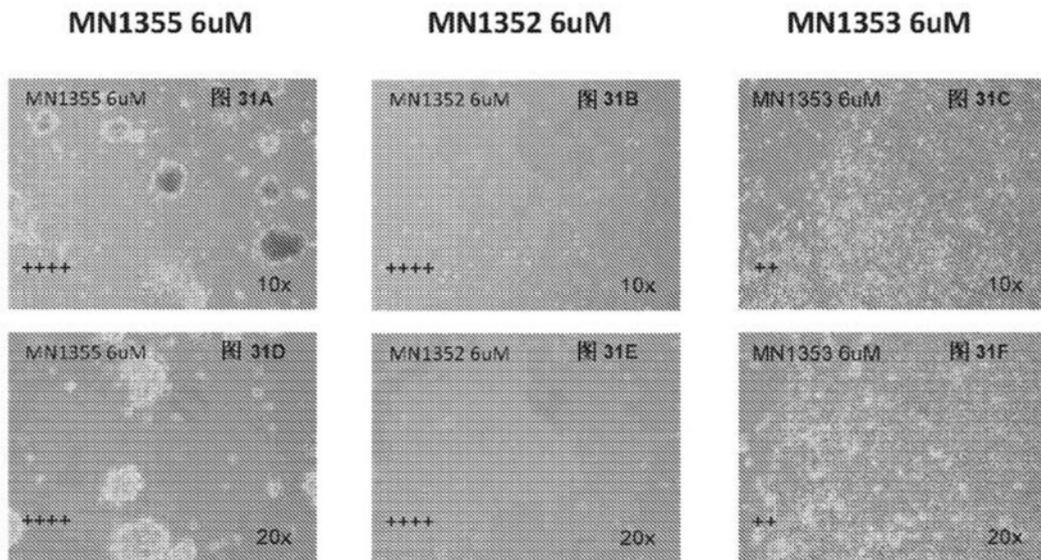
成纤维细胞



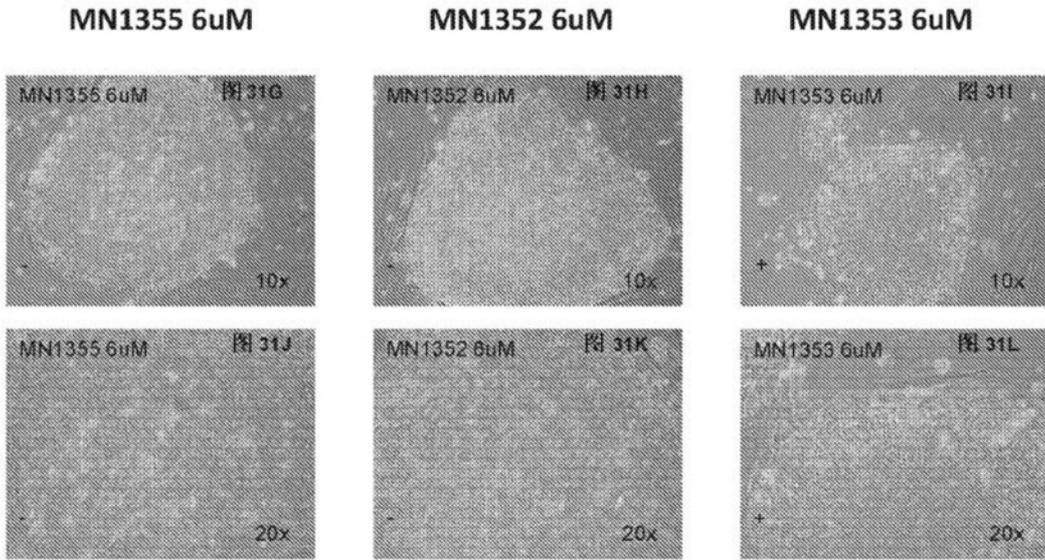
干细胞对照:



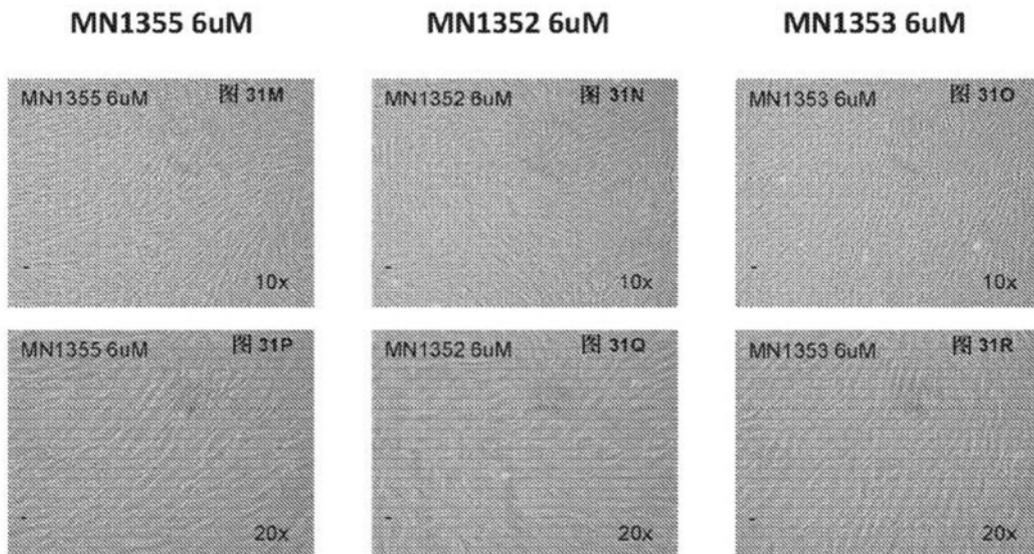
幼稚干细胞



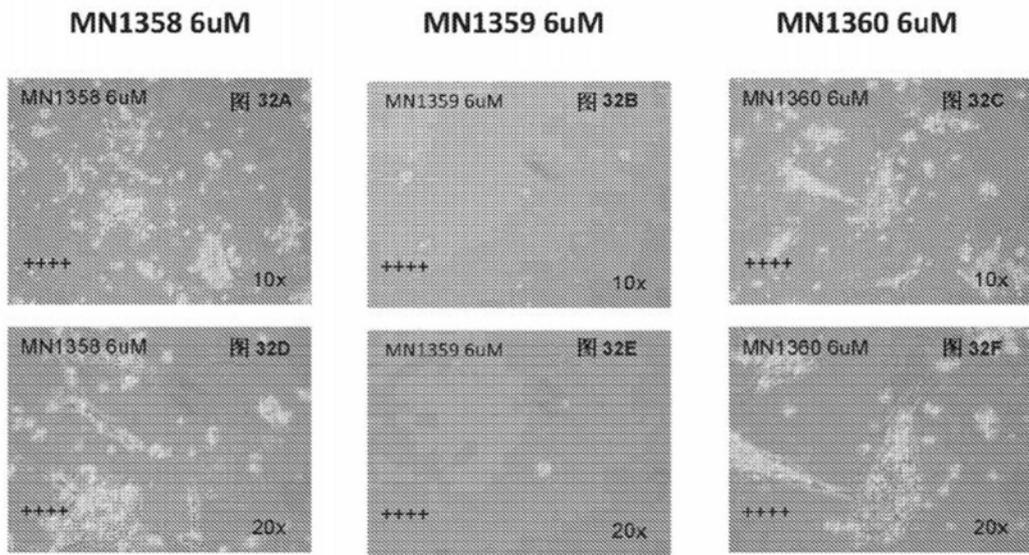
始发干细胞



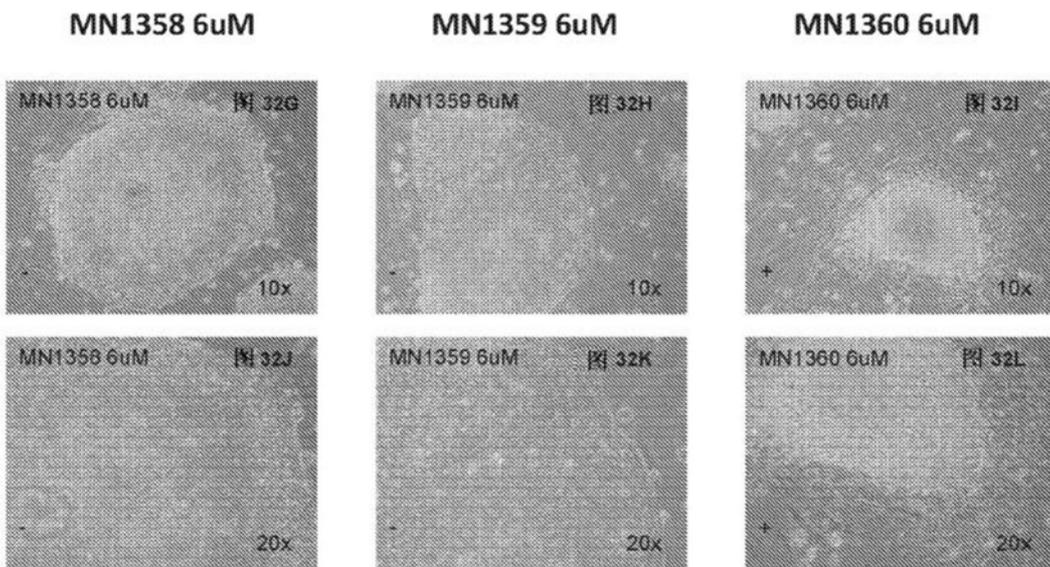
成纤维细胞



幼稚干细胞

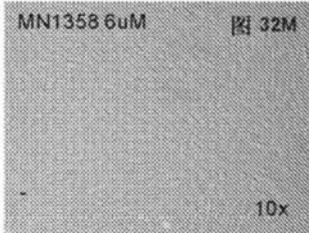


始发干细胞

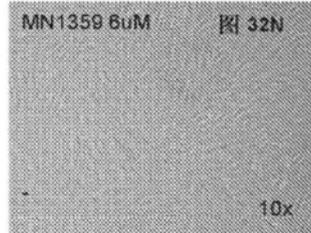


成纤维细胞

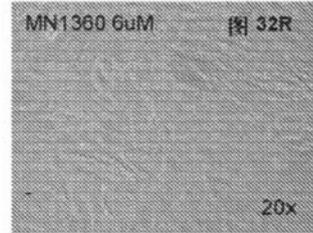
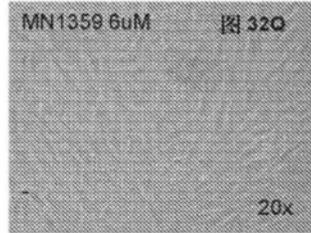
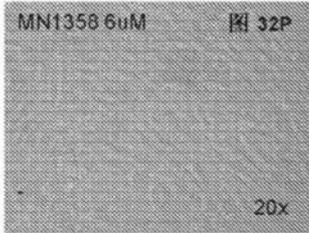
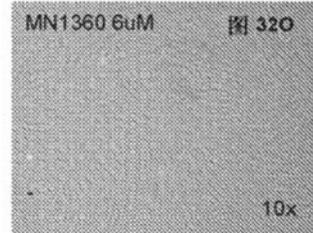
MN1358 6uM



MN1359 6uM

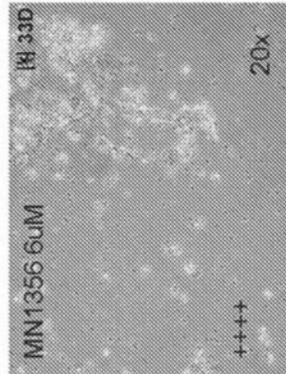
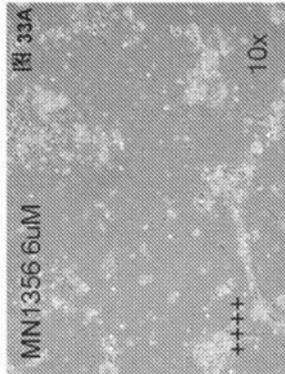


MN1360 6uM

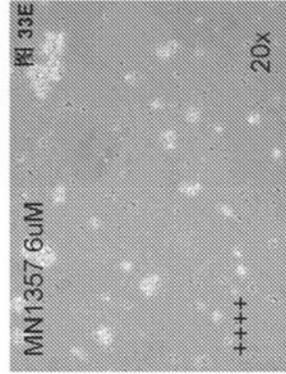
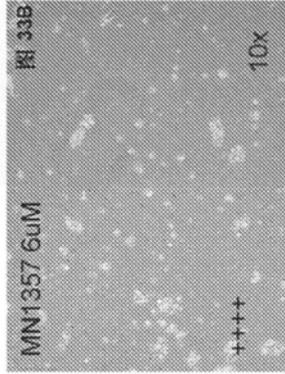


幼稚干细胞

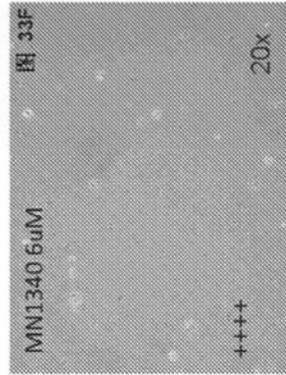
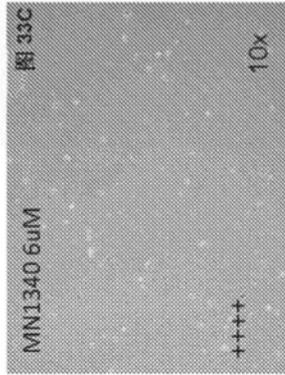
MN1356 6uM



MN1357 6uM

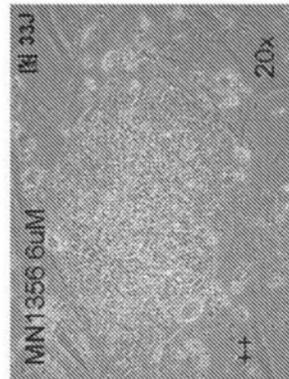


MN1340 6uM

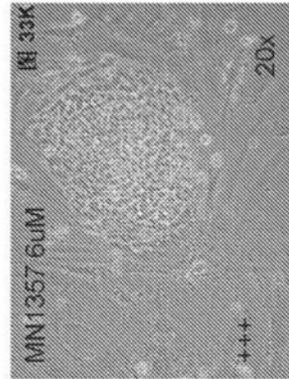
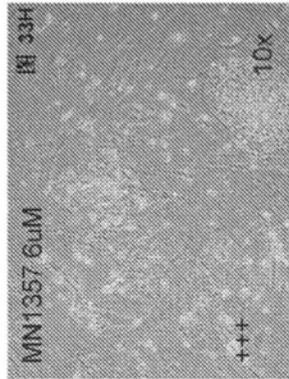


始发干细胞

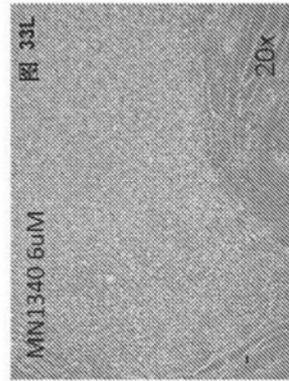
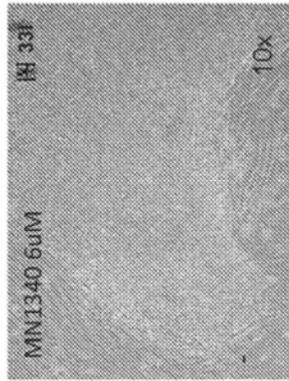
MN1356 6uM



MN1357 6uM



MN1340 6uM

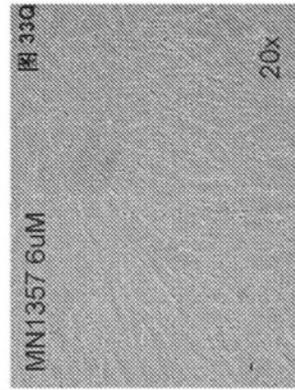
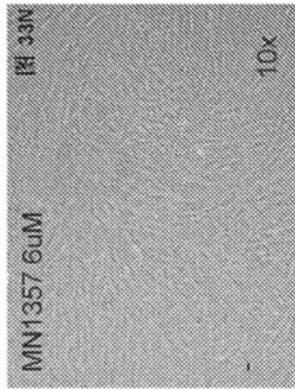


成纤维细胞

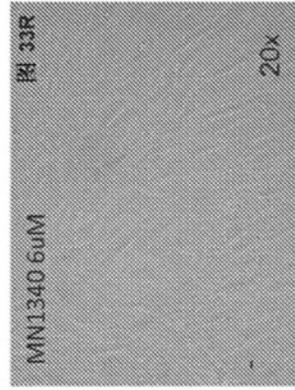
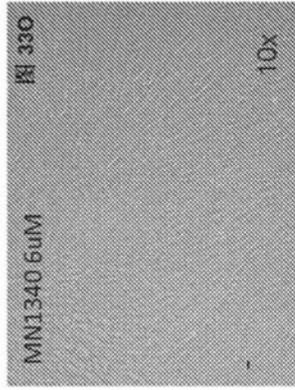
MN1356 6uM



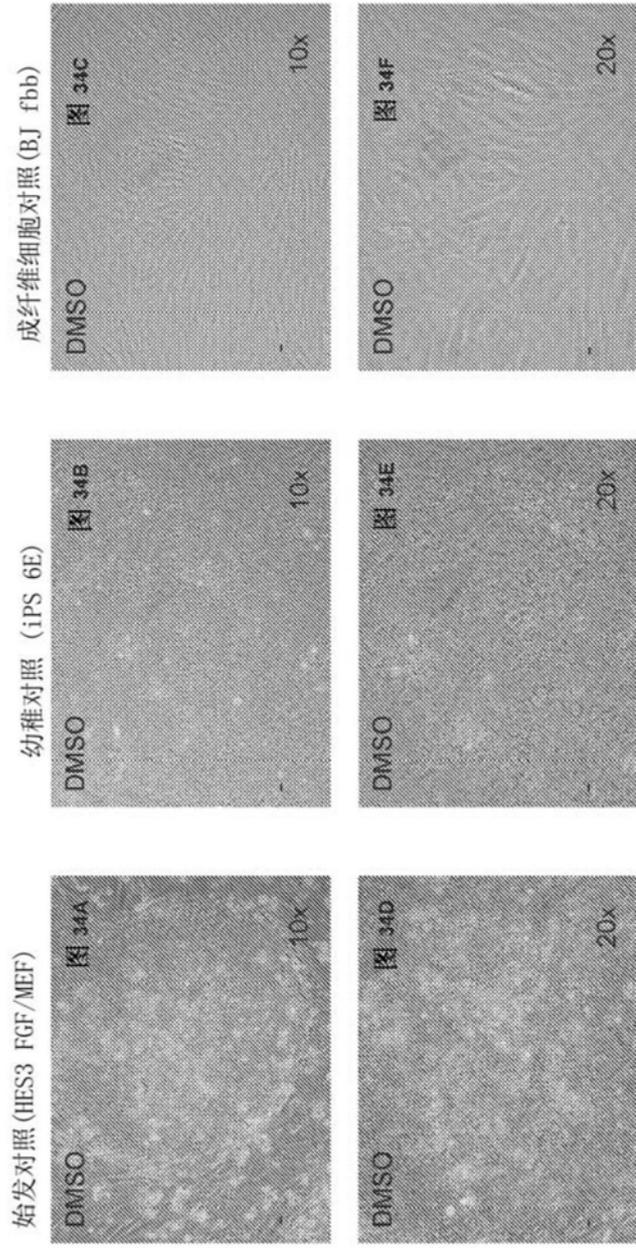
MN1357 6uM



MN1340 6uM

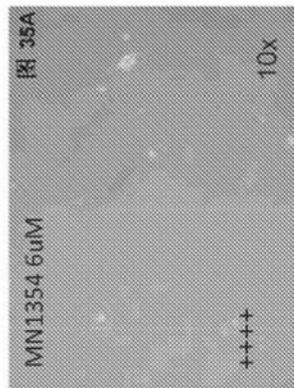


干细胞对照:

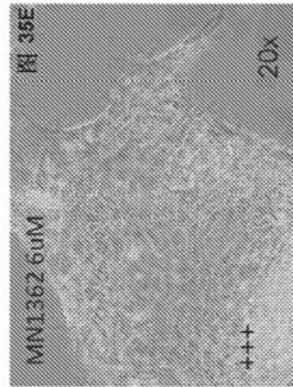
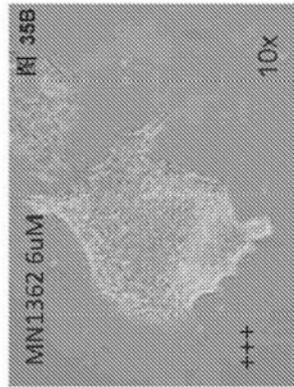


幼稚干细胞

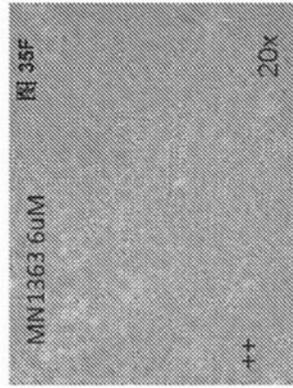
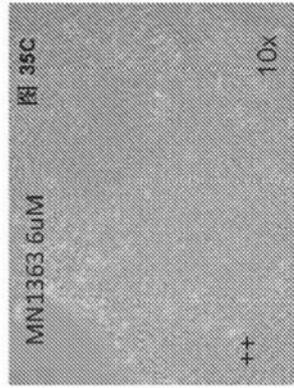
MN1354 6uM



MN1362 6uM

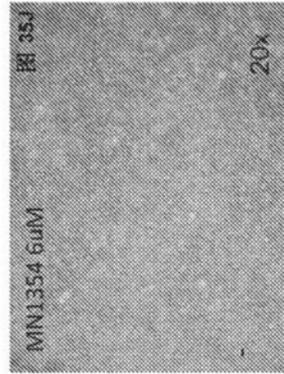
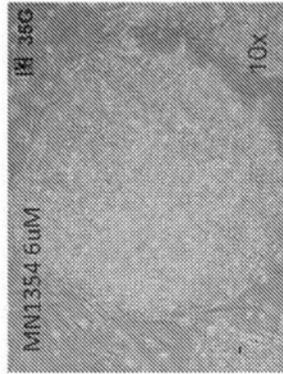


MN1363 6uM

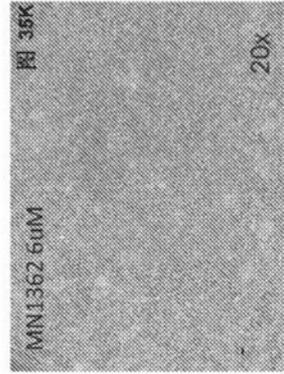
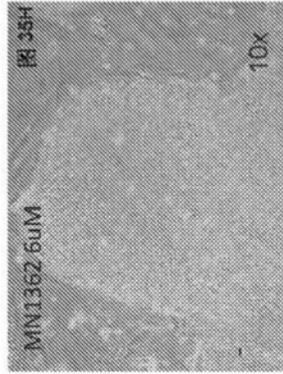


始发干细胞

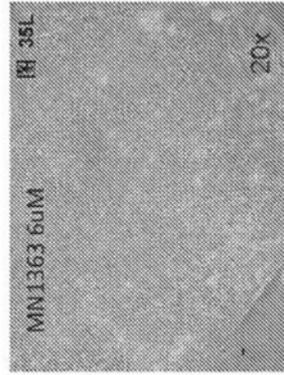
MN1354 6uM



MN1362 6uM

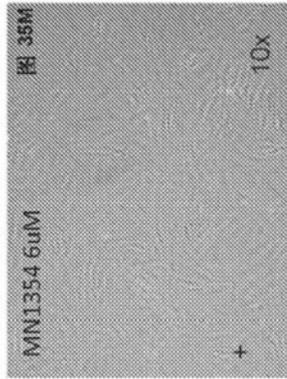


MN1363 6uM

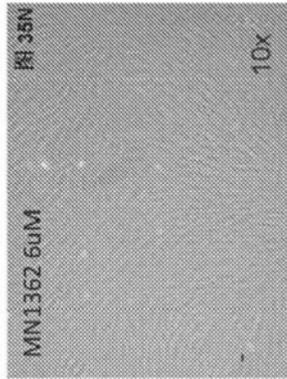


成纤维细胞

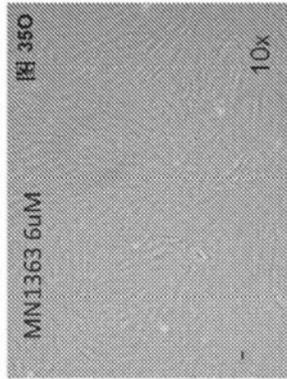
MN1354 6uM



MN1362 6uM



MN1363 6uM



MN1354 6uM



MN1362 6uM



MN1363 6uM



细胞迁移测定T47D乳腺癌 (120h)

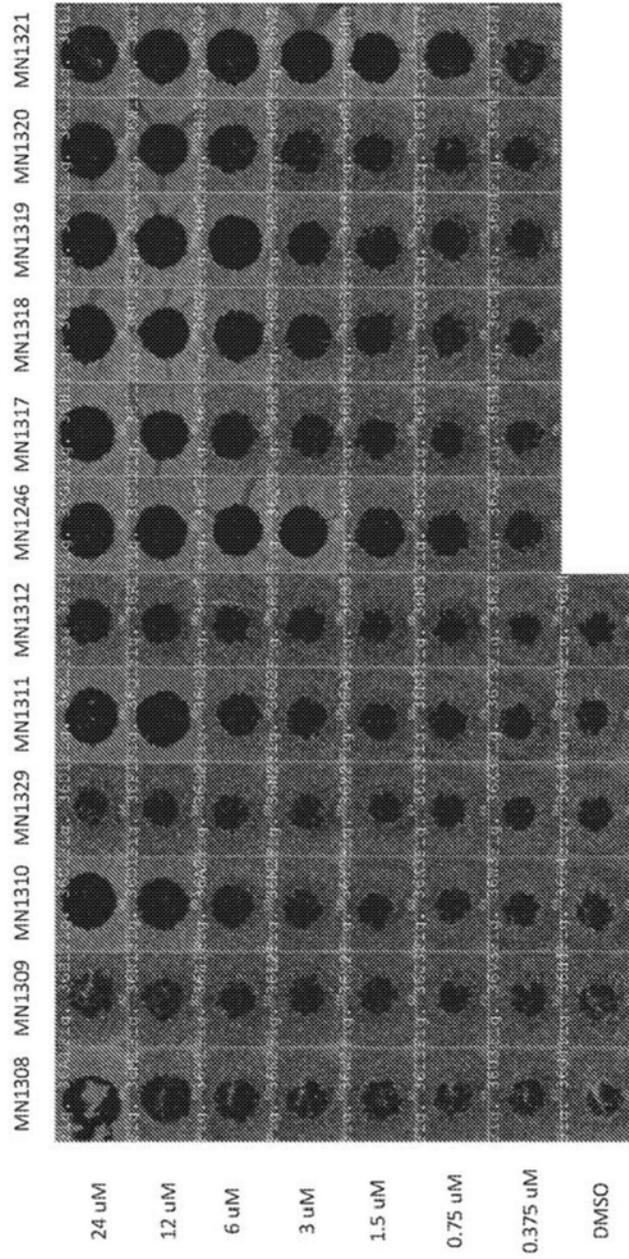


图36

癌细胞迁移值的IC50抑制(120h)：数据符合4-参数Hill方程

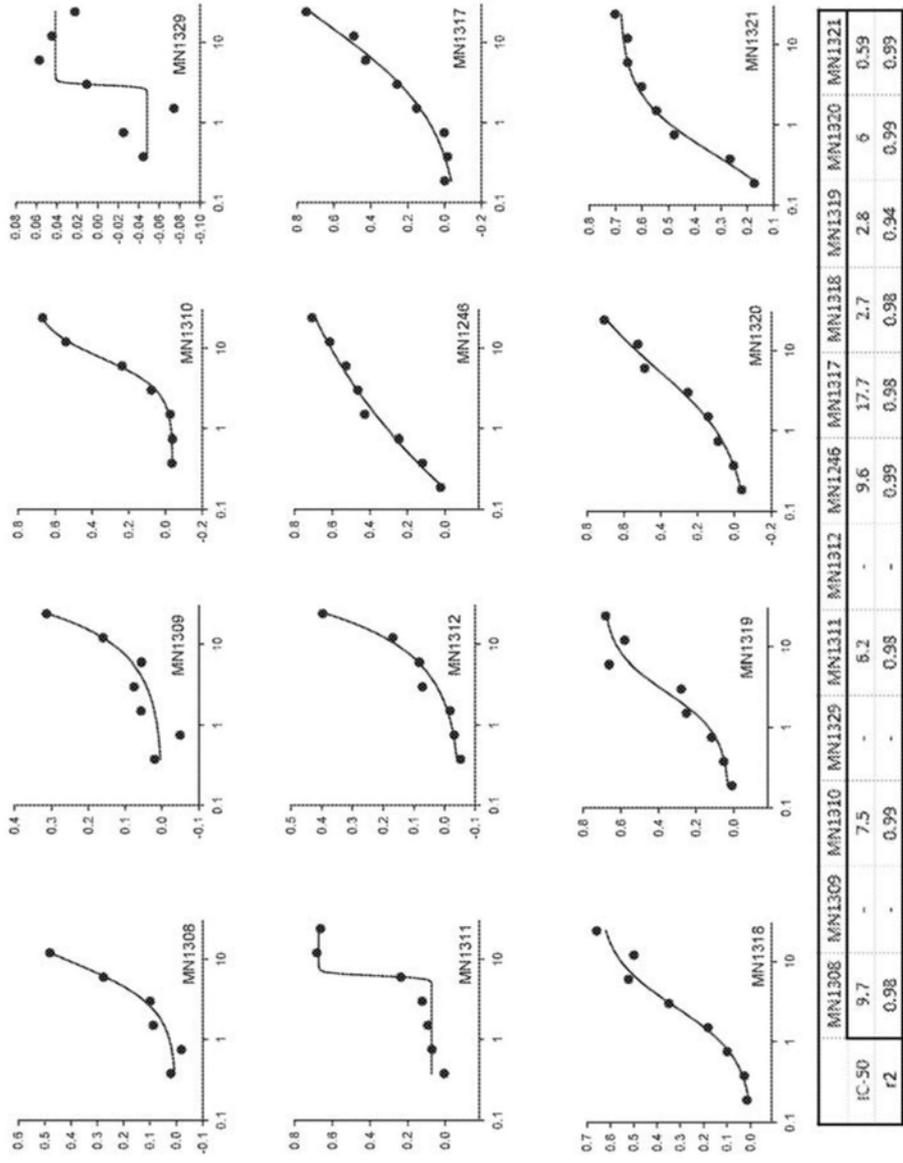


图37

细胞迁移测定T47D乳腺癌 (120h)

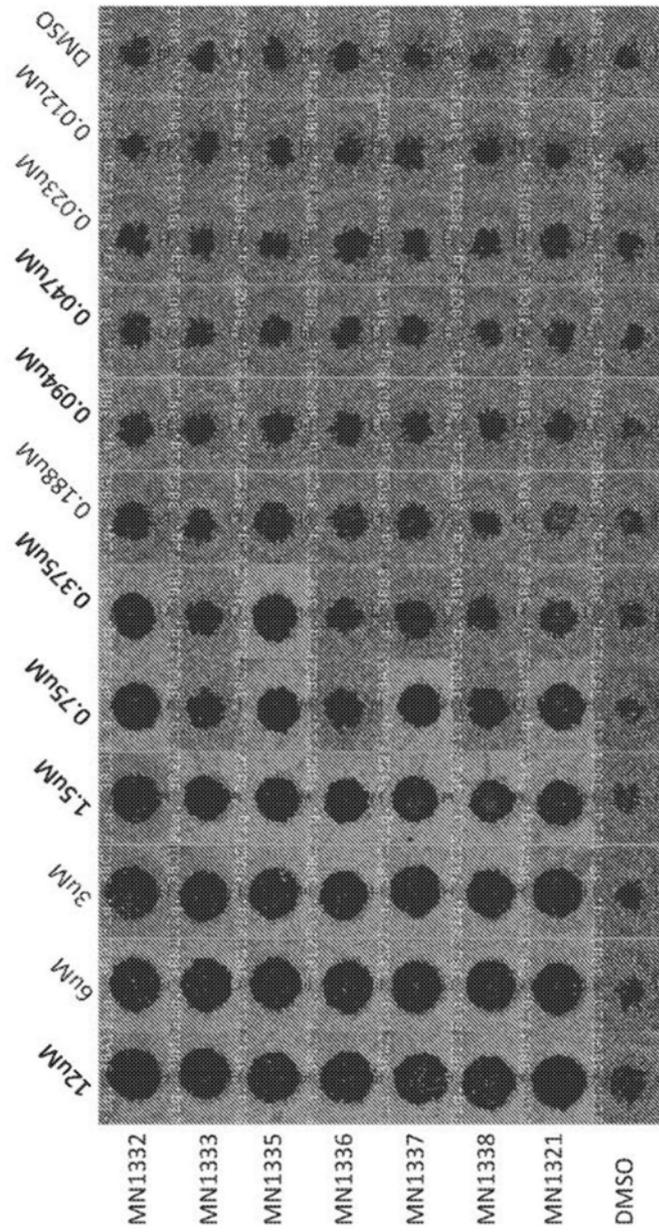


图38

癌细胞迁移值的IC50抑制(120h)；数据符合4-参数Hi11方程

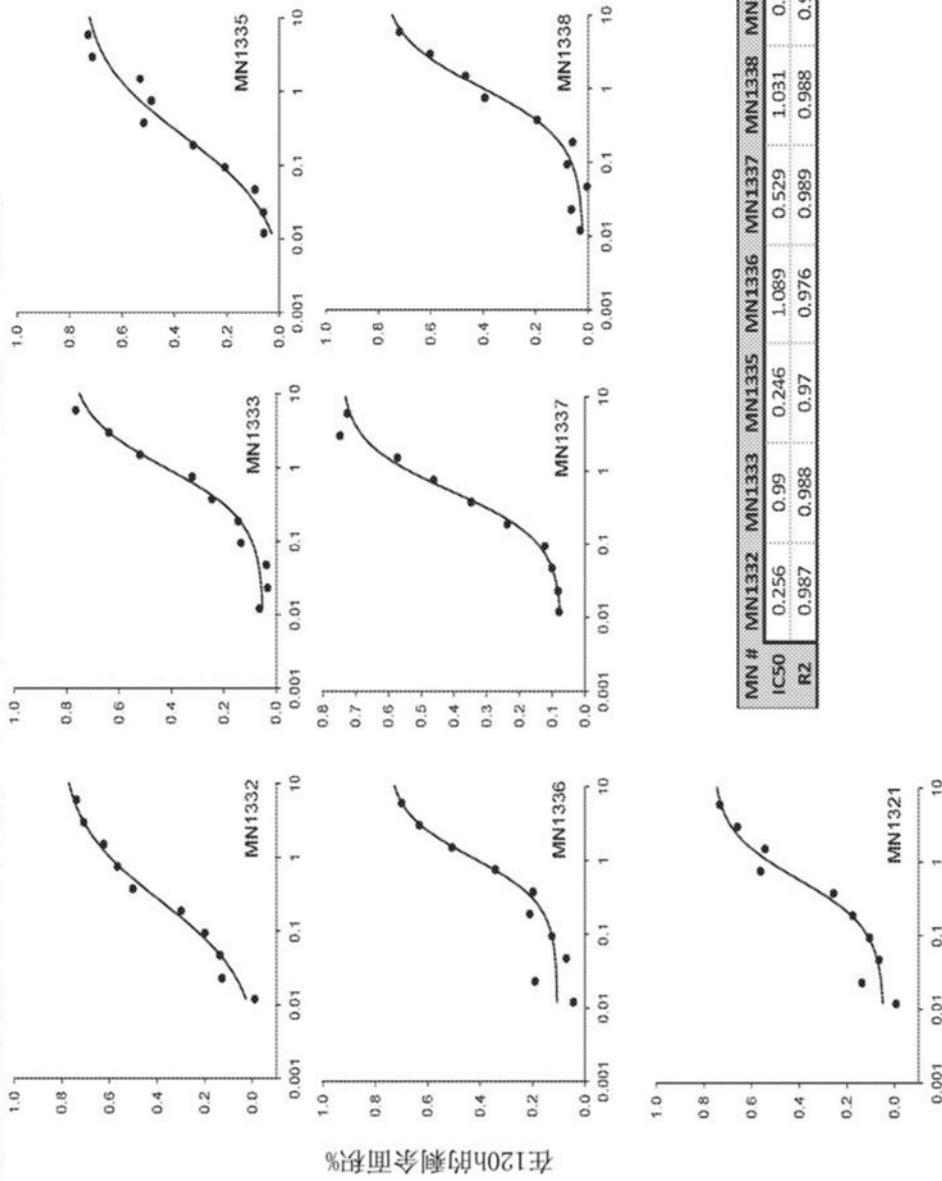


图39

细胞迁移测定T47D乳腺癌 (120h)

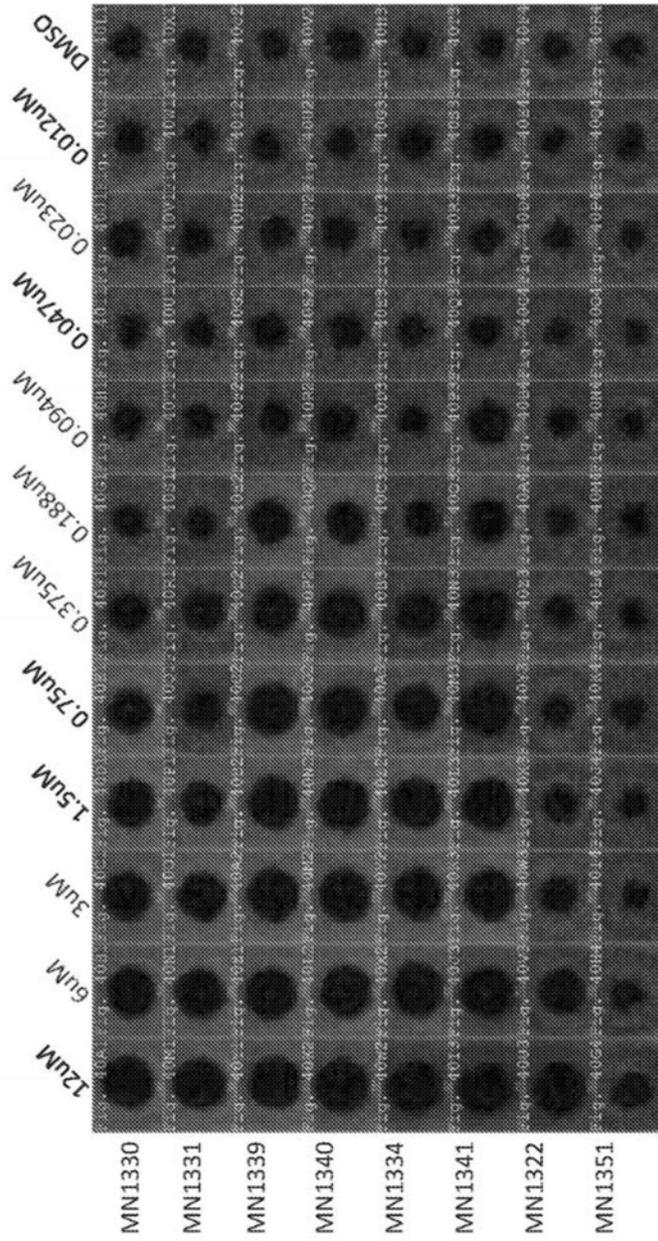


图40

癌细胞迁移值的IC50抑制(120h)；数据符合4-参数Hill方程

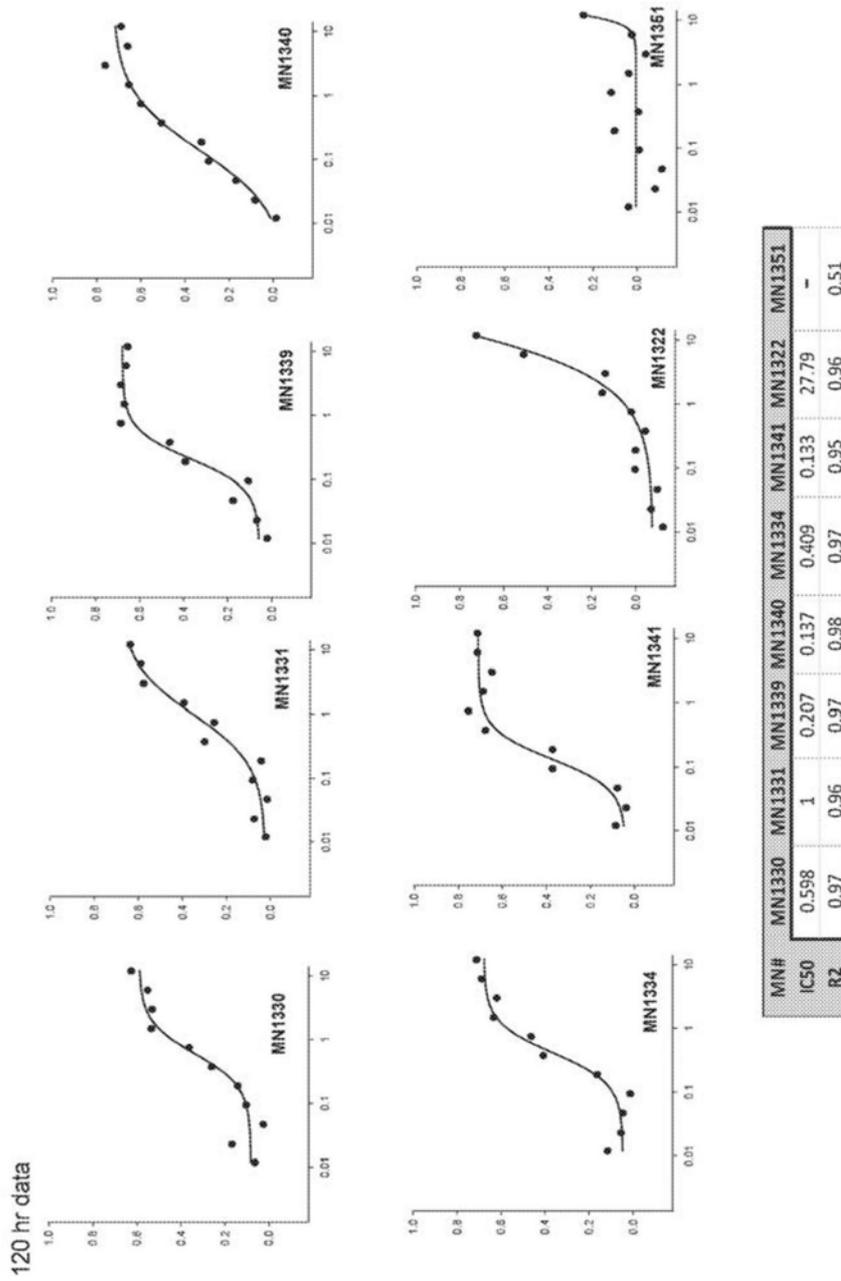


图41

细胞迁移测定T47D乳腺癌 (122h)

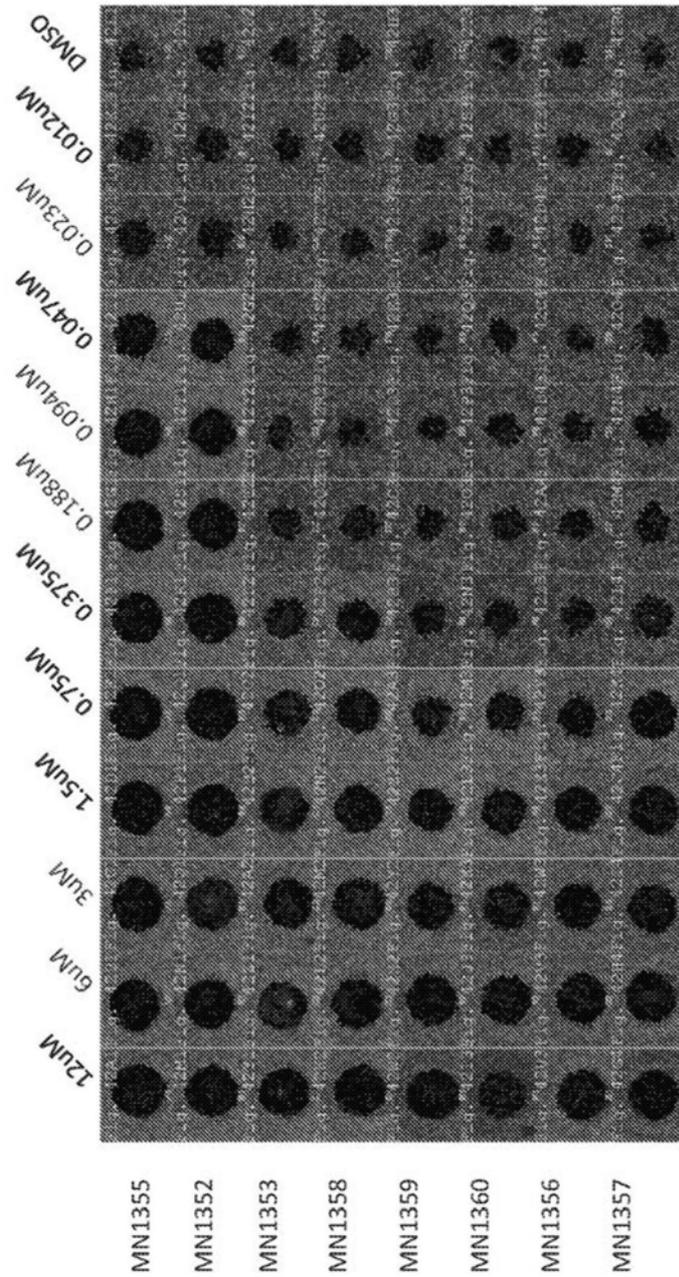
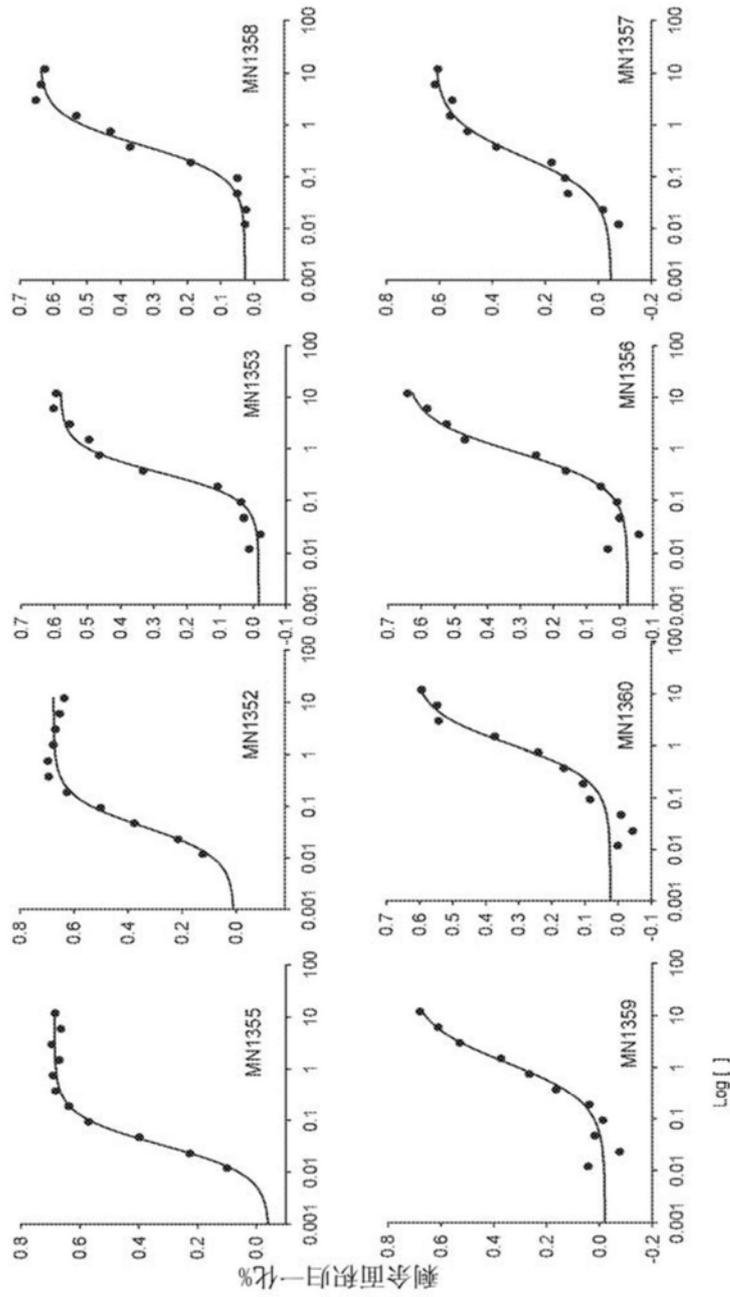


图42

癌细胞迁移值的IC50抑制(122h)；数据符合4-参数Hill方程



MN#	MN1355	MN1352	MN1353	MN1358	MN1359	MN1360	MN1356	MN1357
IC50	0.033	0.04	0.341	0.399	1.24	1.038	0.85	0.243
R2	0.997	0.99	0.99	0.986	0.986	0.965	0.99	0.982

图43

细胞迁移测定T47D乳腺癌 (124h)

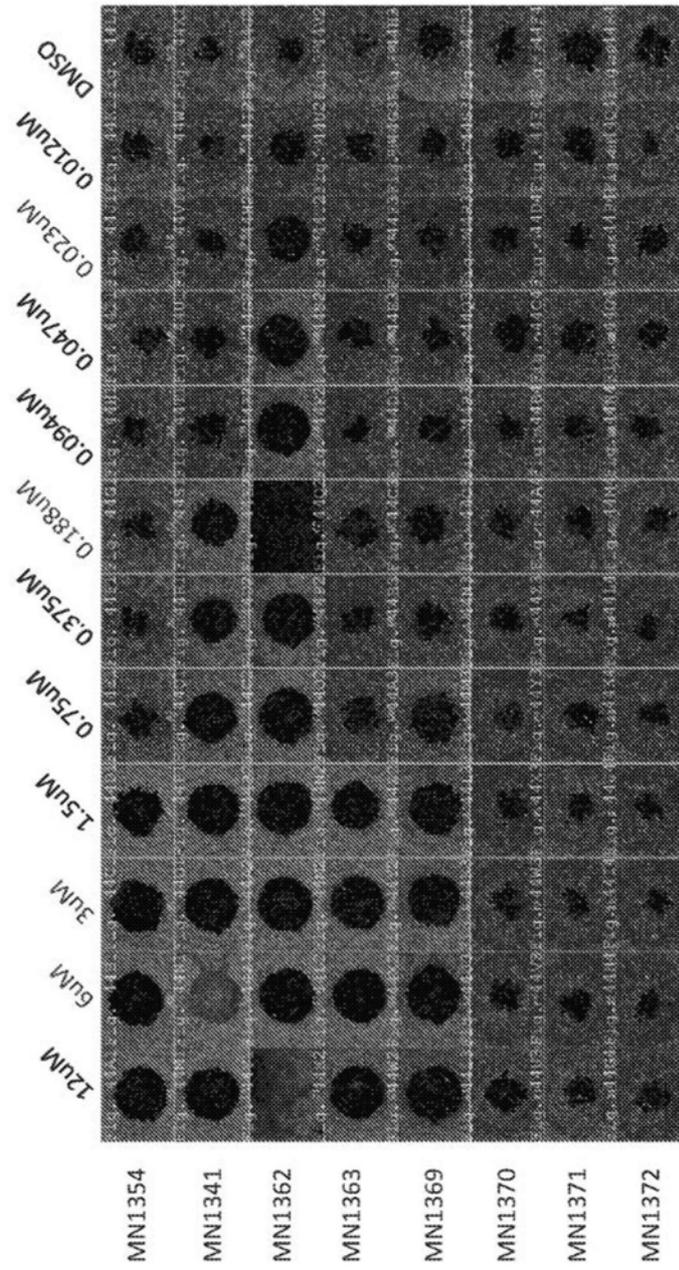


图44

癌细胞迁移移值的IC50抑制(124h) ; 数据符合4-参数Hill方程

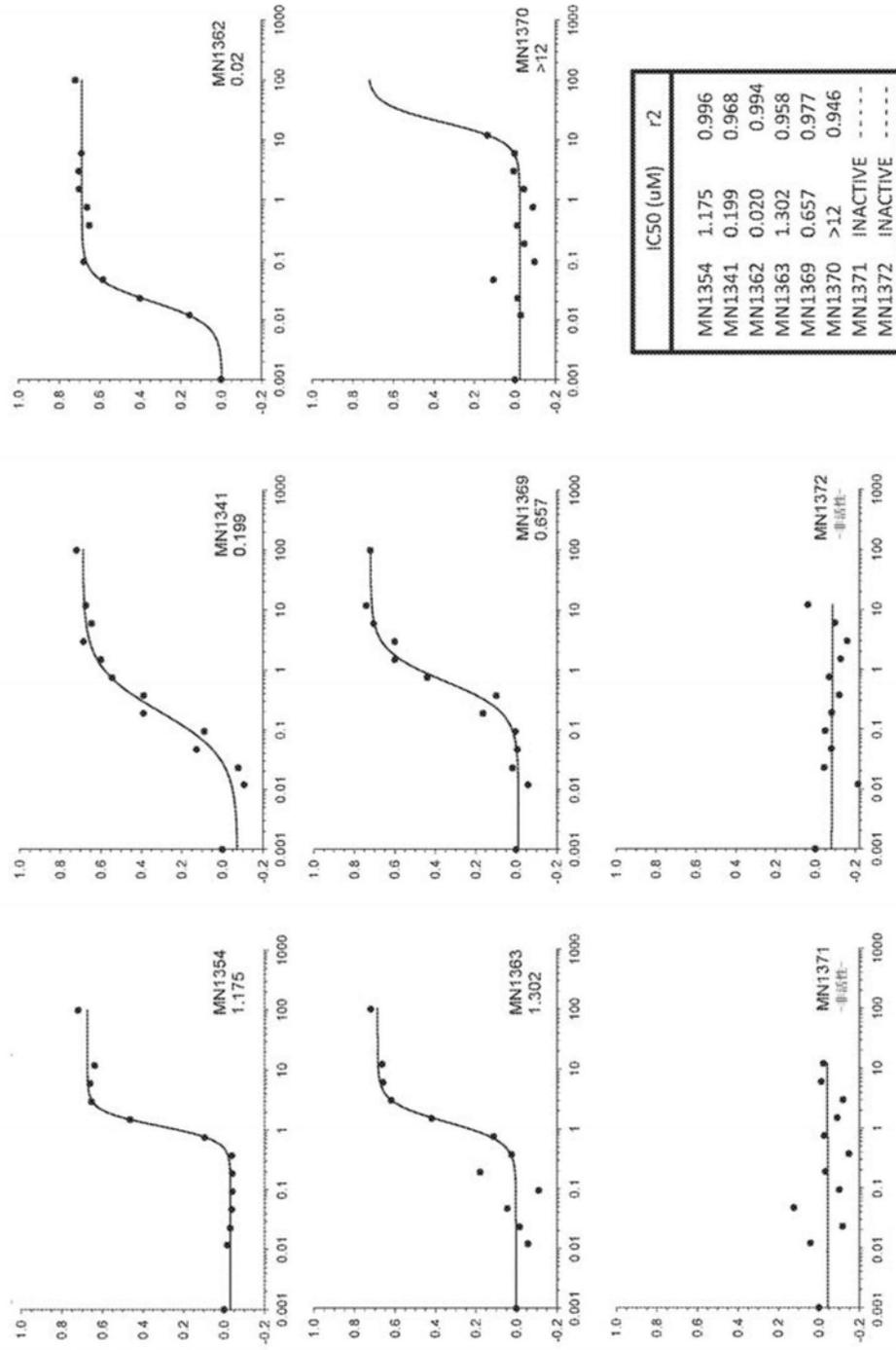
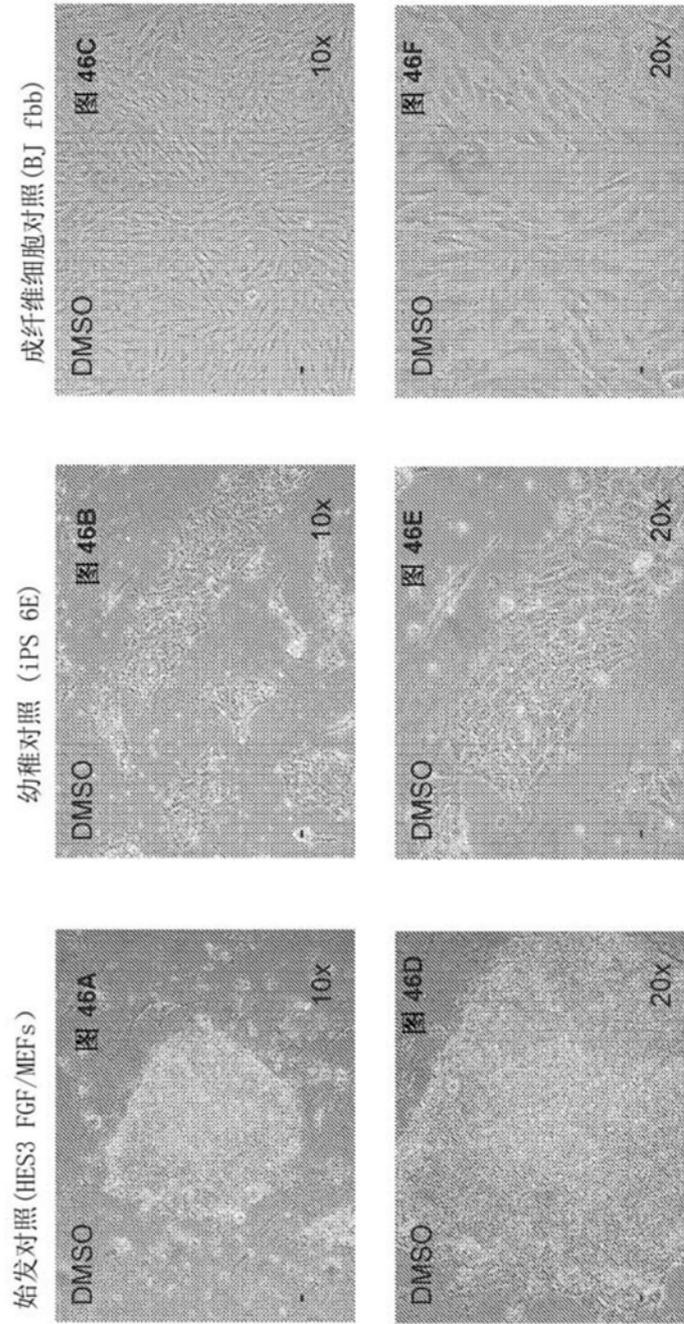


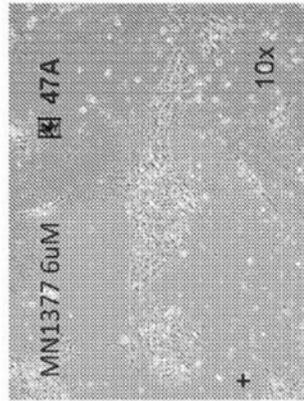
图45

干细胞对照:

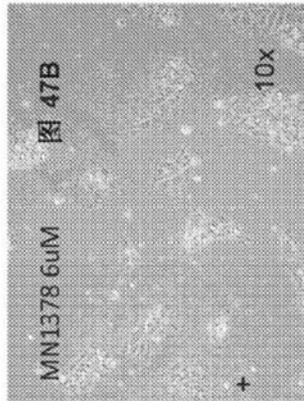


幼稚干细胞

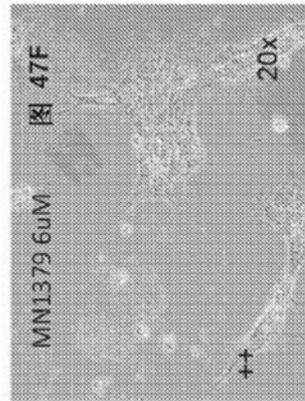
MN1377 6uM



MN1378 6uM

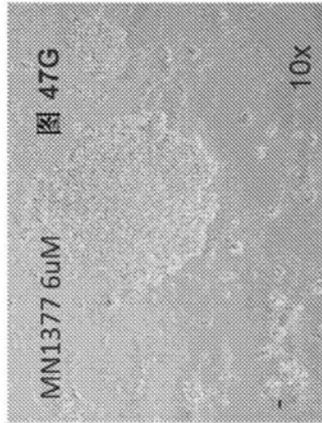


MN1379 6uM

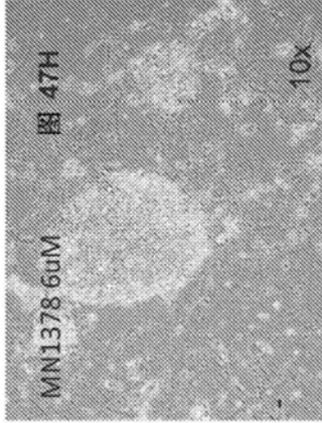


始发干细胞

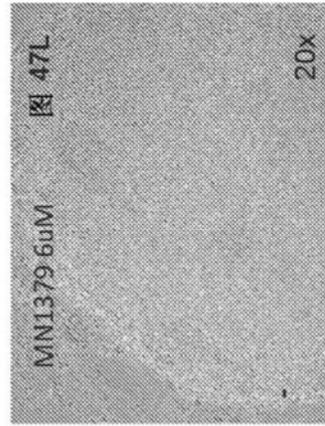
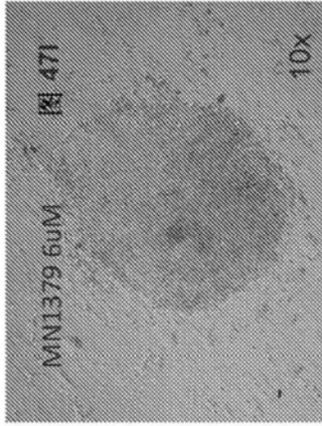
MN1377 6uM



MN1378 6uM

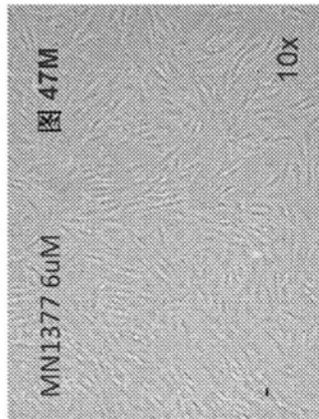


MN1379 6uM

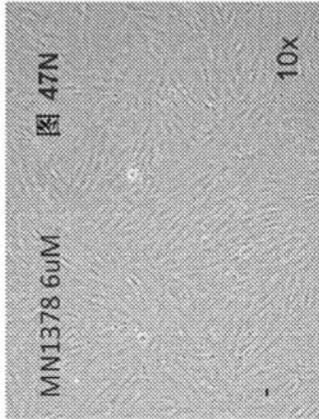


成纤维细胞

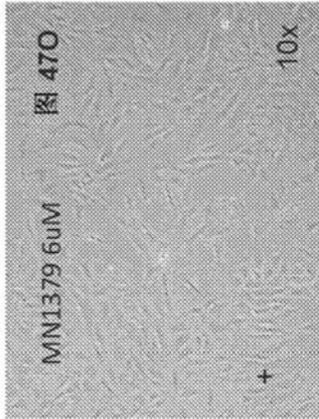
MN1377 6uM



MN1378 6uM

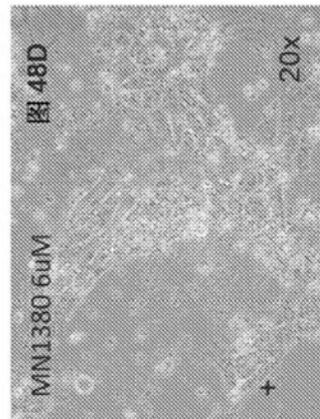
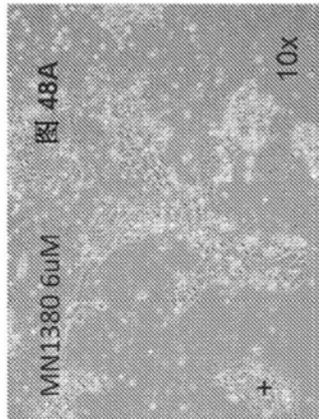


MN1379 6uM

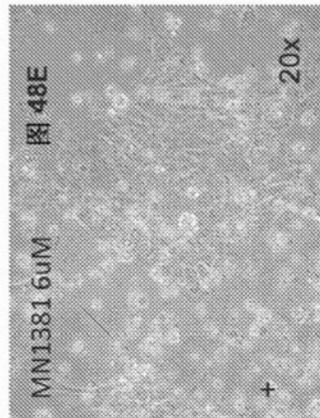


幼稚干细胞

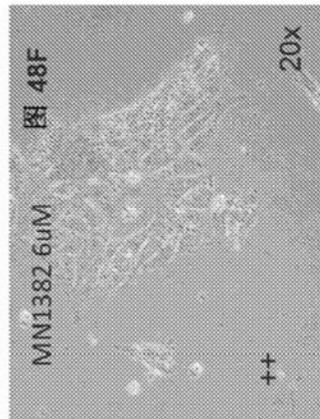
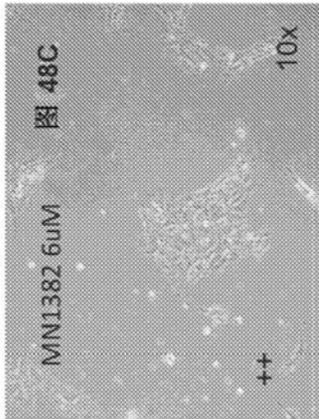
MN1380 6uM



MN1381 6uM

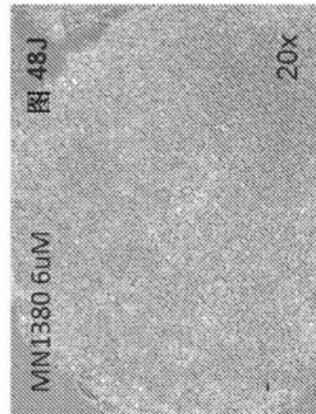
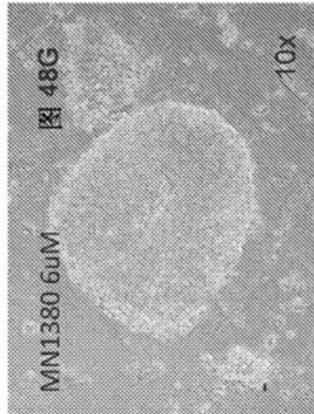


MN1382 6uM

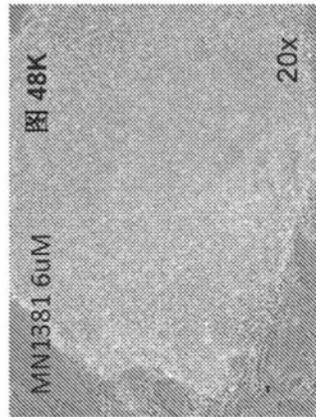
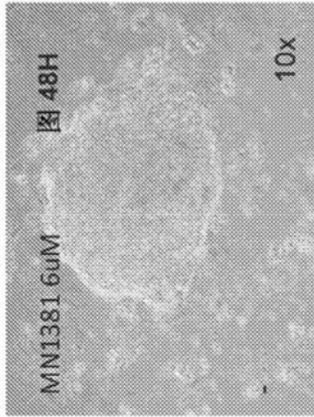


始发干细胞

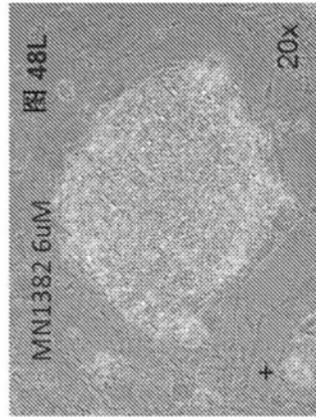
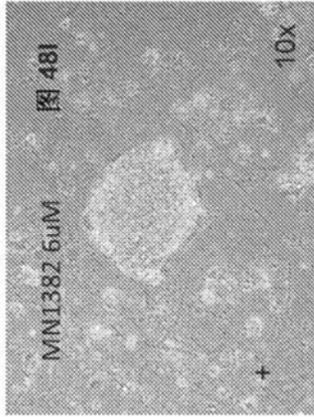
MN1380 6uM



MN1381 6uM

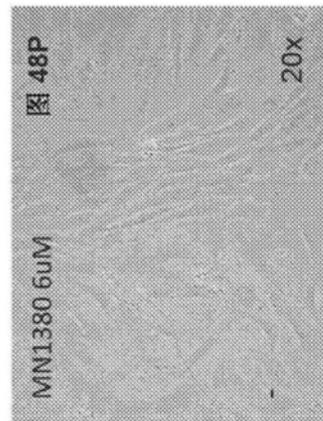
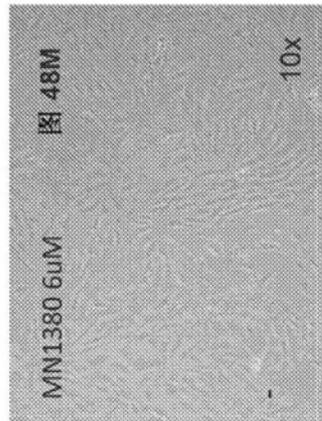


MN1382 6uM

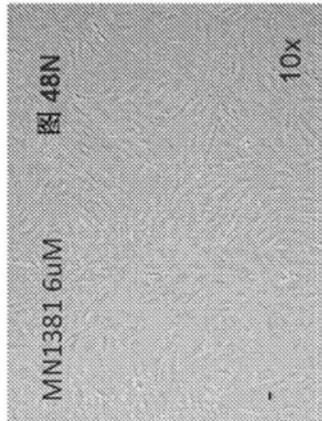


成纤维细胞

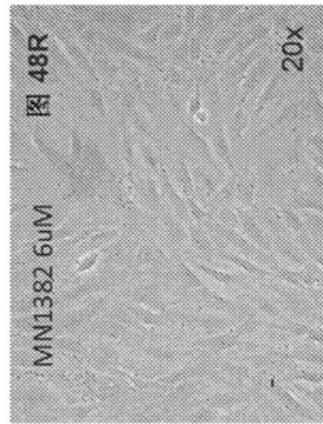
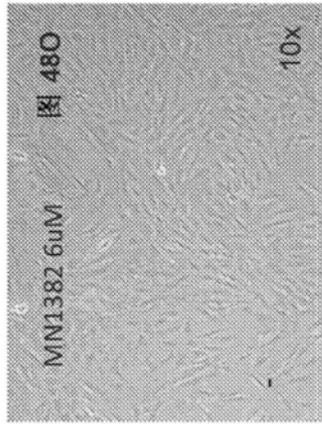
MN1380 6uM



MN1381 6uM

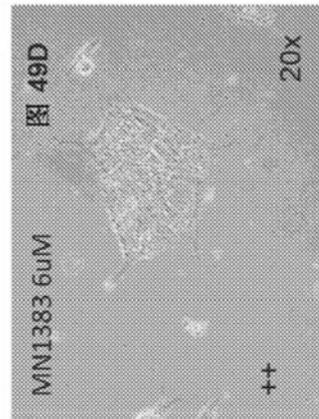
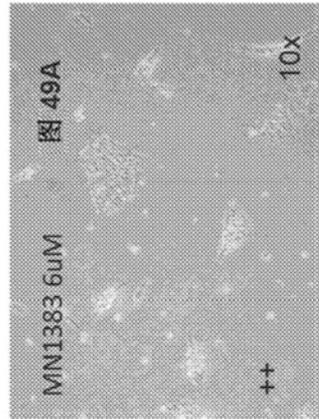


MN1382 6uM

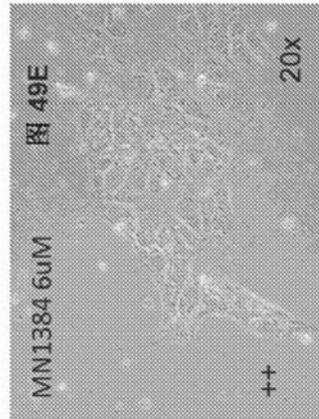


幼稚干细胞

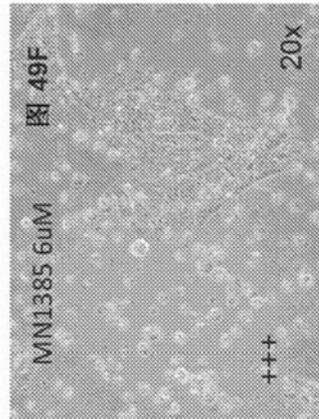
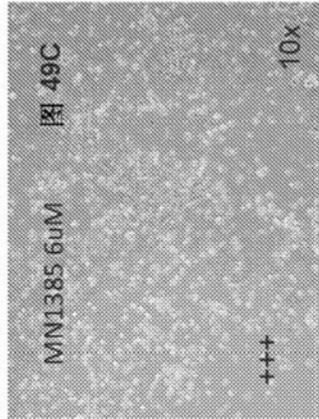
MN1383 6uM



MN1384 6uM

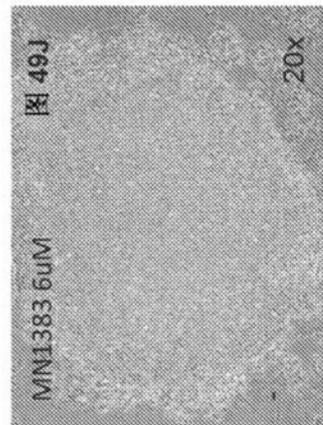
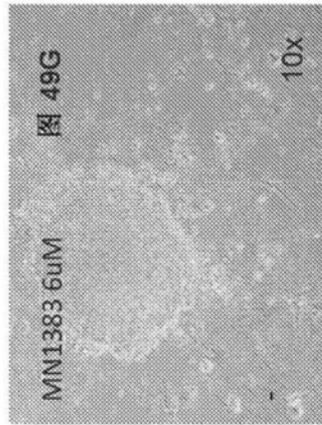


MN1385 6uM

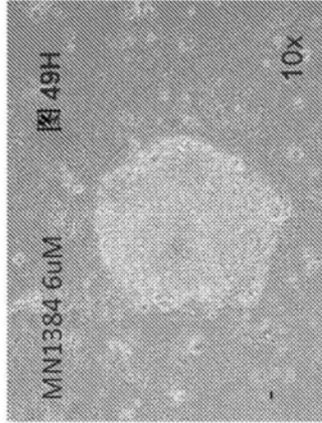


始发干细胞

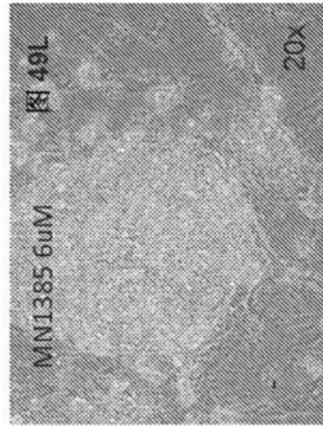
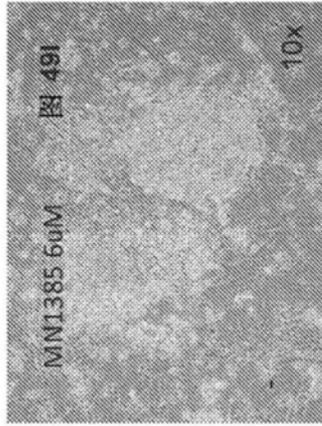
MN1383 6uM



MN1384 6uM

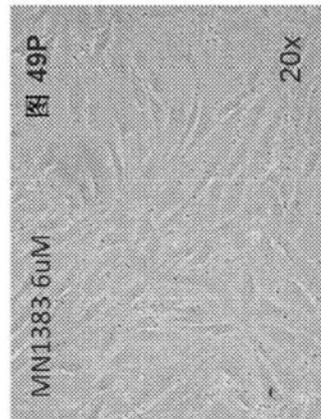
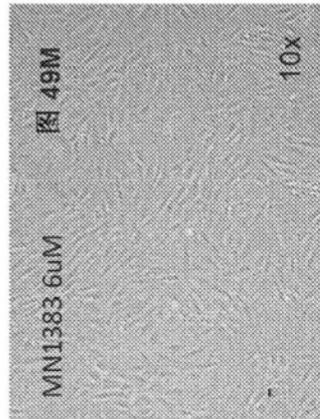


MN1385 6uM

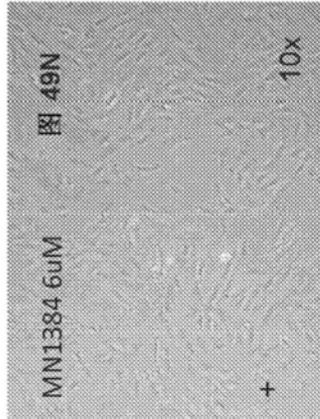


成纤维细胞

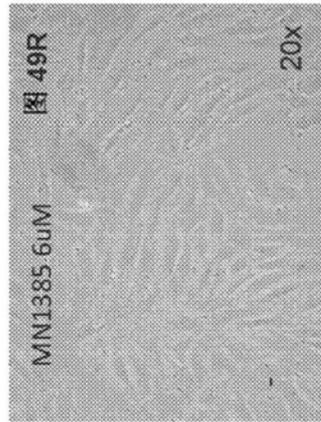
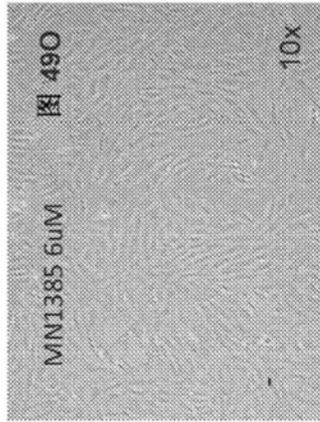
MN1383 6uM



MN1384 6uM



MN1385 6uM



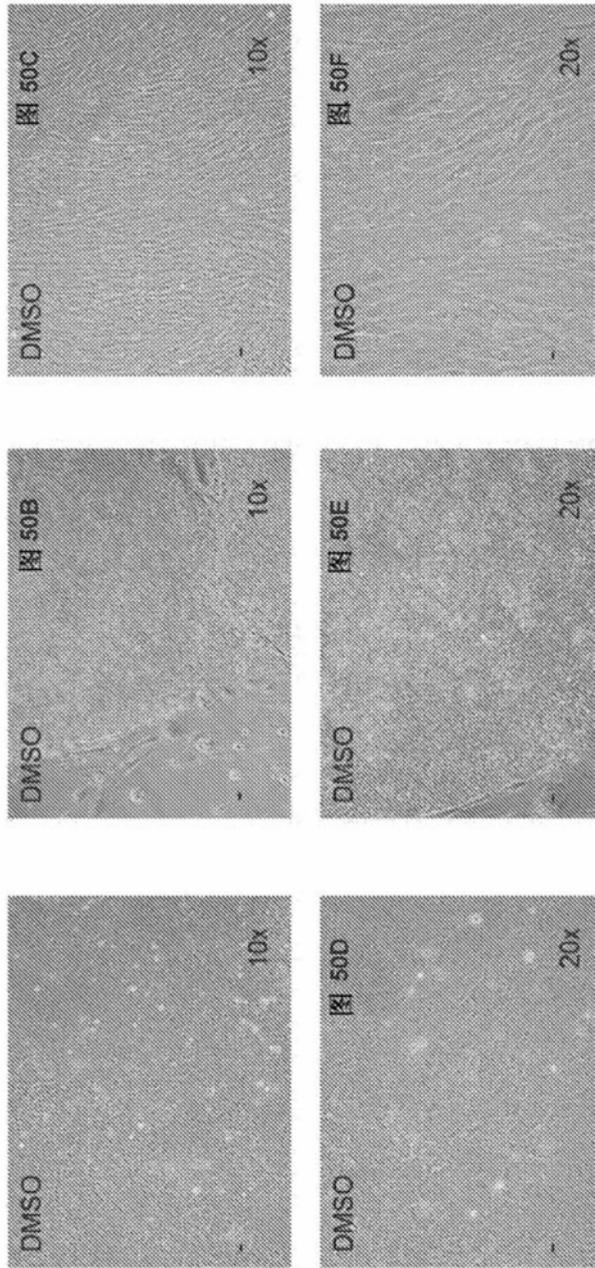


图50A-50F

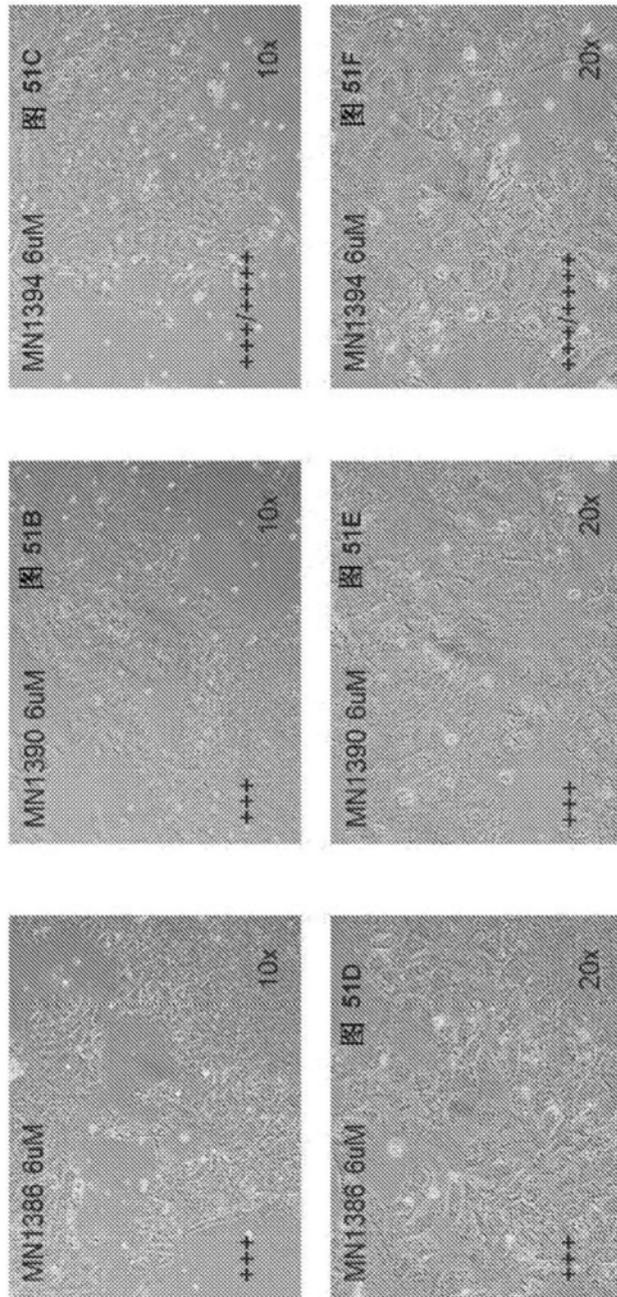
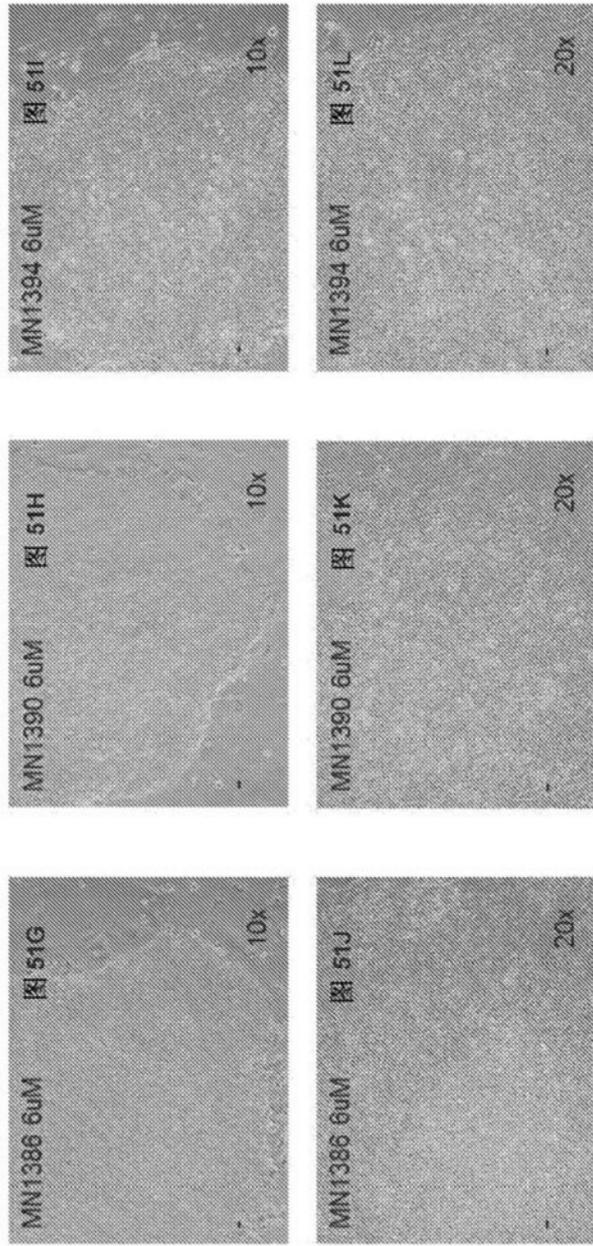
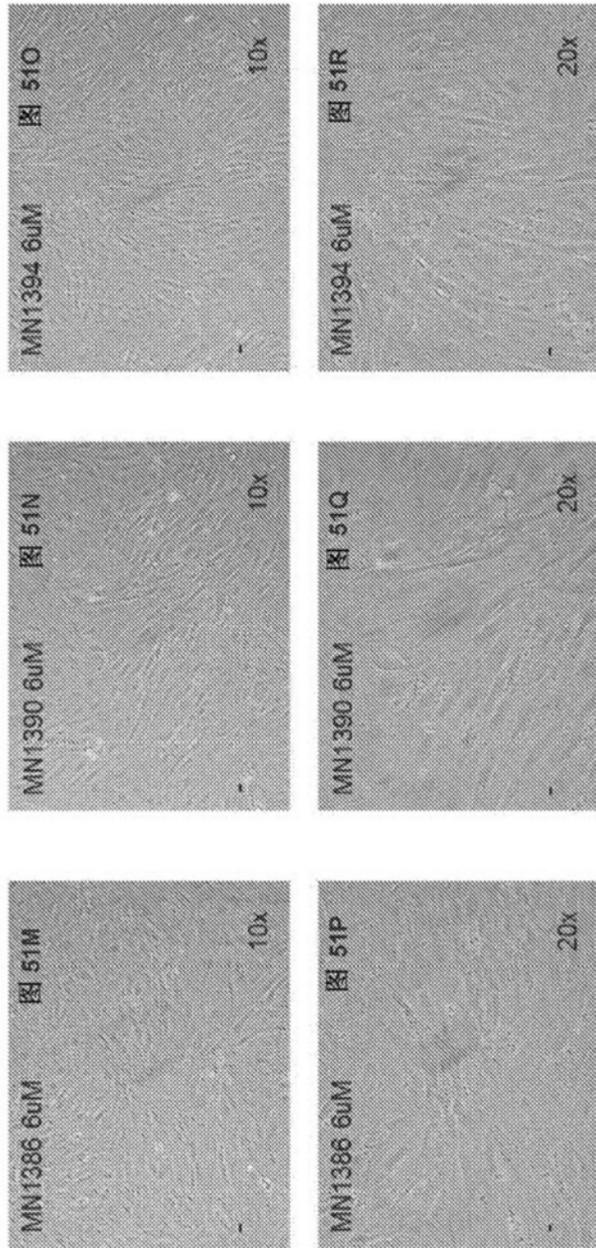


图51A-51F

始发干细胞



成纤维细胞



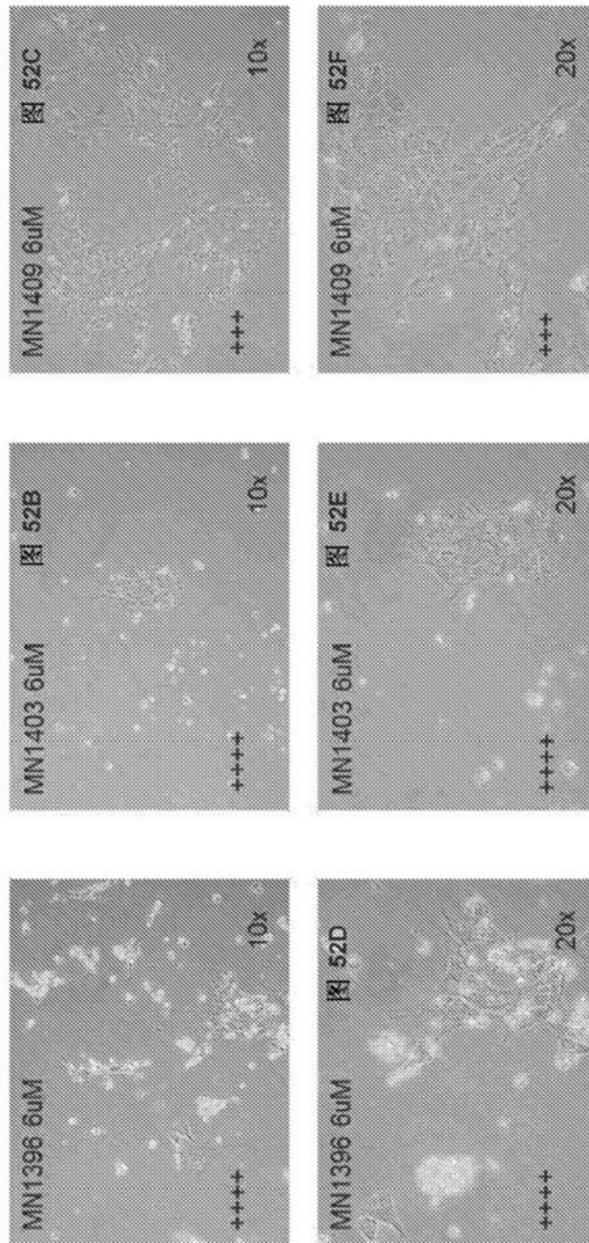
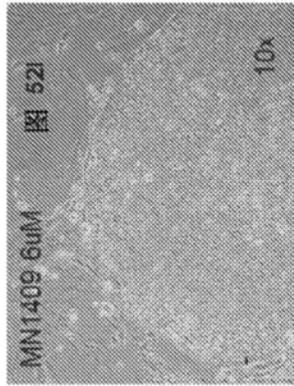
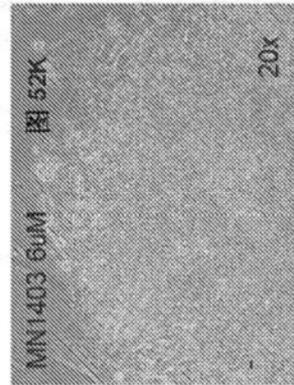
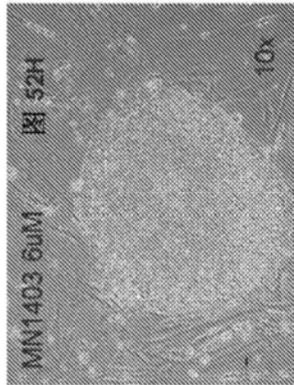
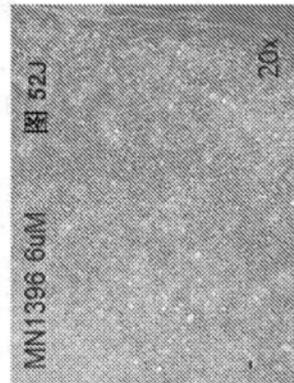
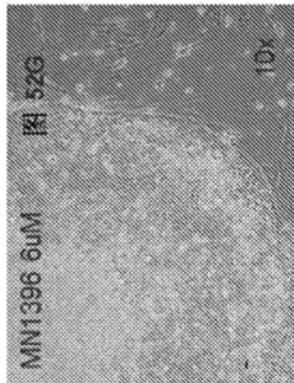
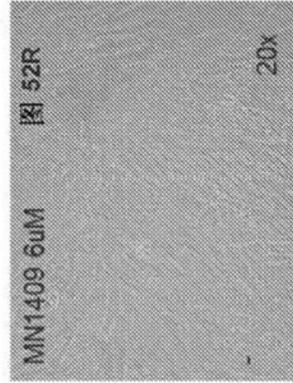
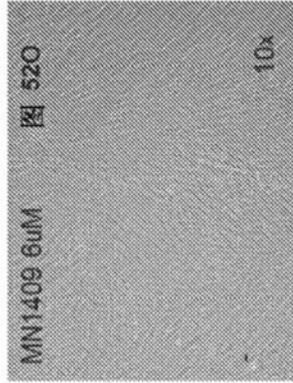
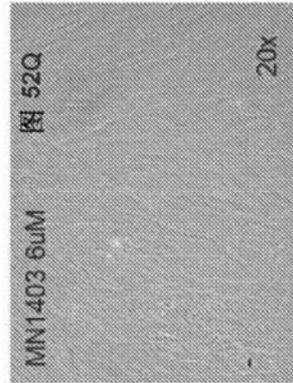
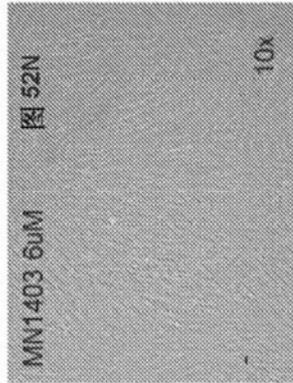
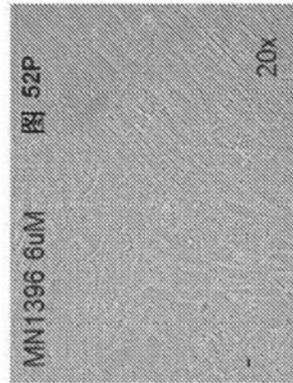
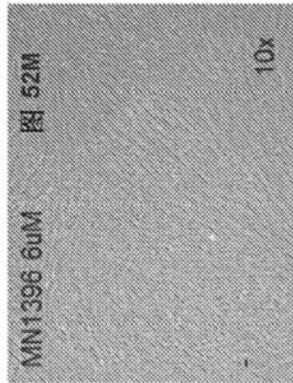


图52A-52F

始发干细胞



成纤维细胞



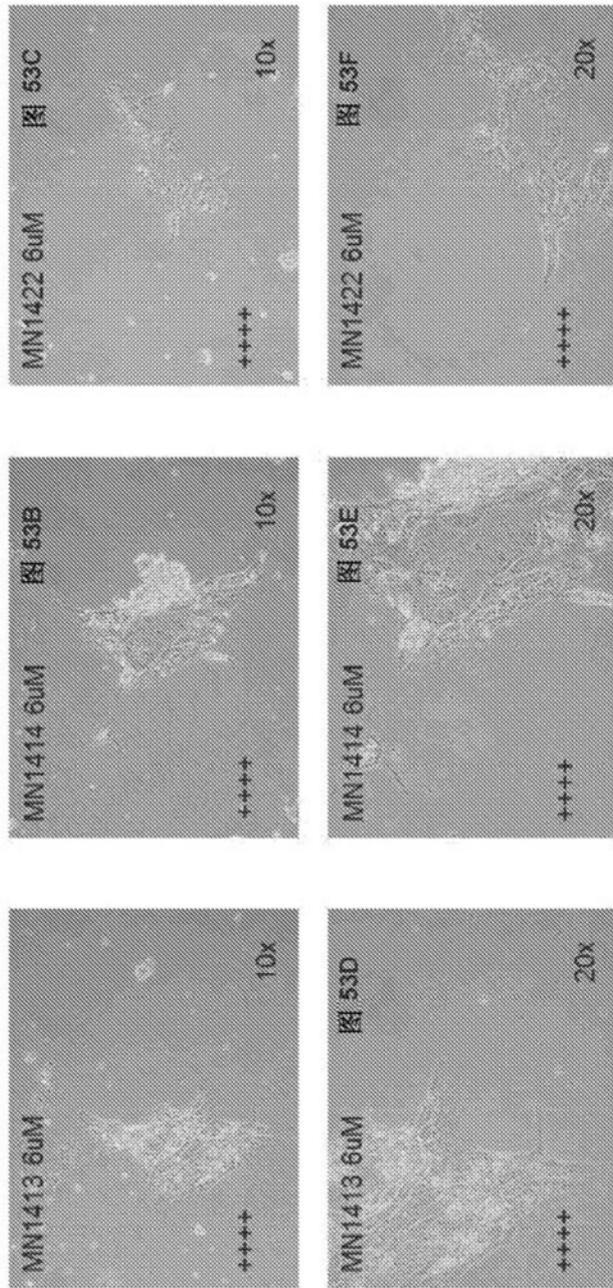
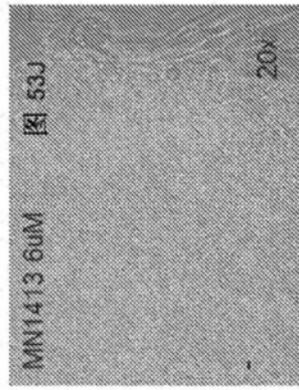
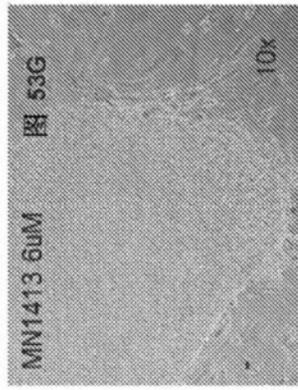
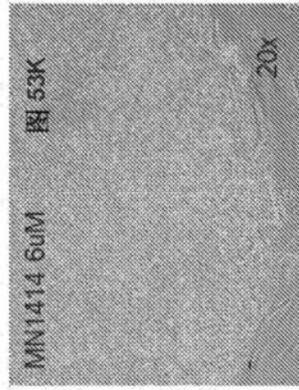
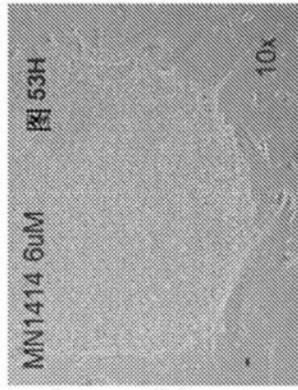
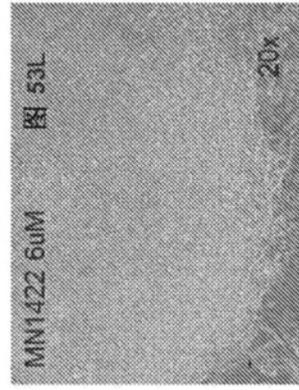
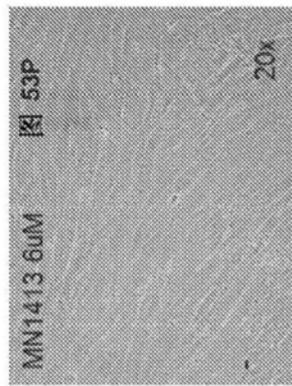
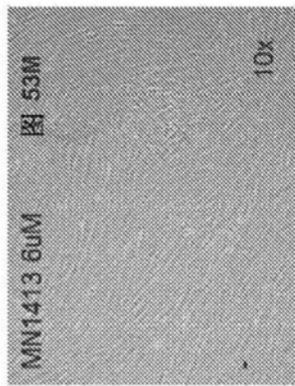
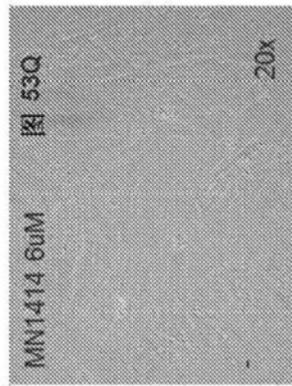
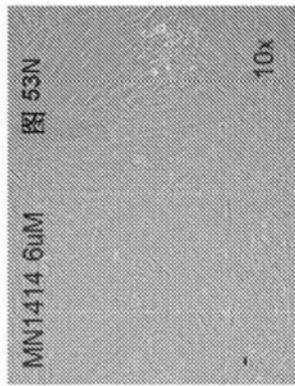
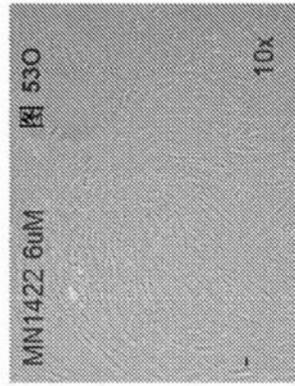


图53A-53F

始发干细胞



成纤维细胞



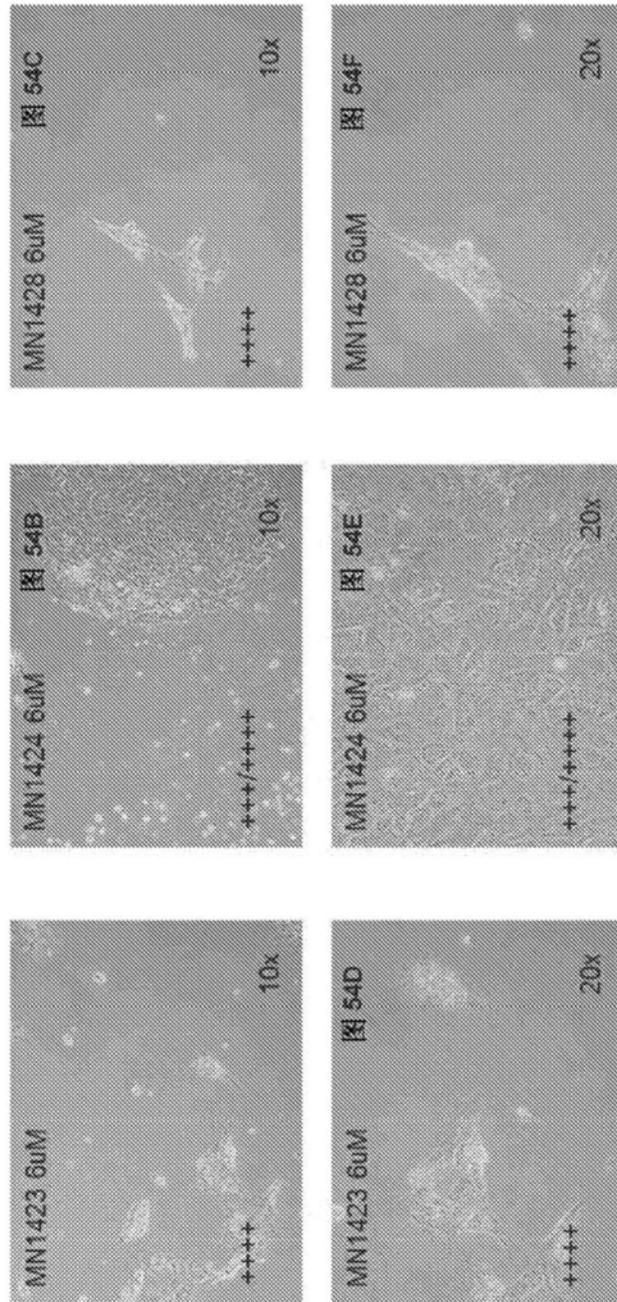
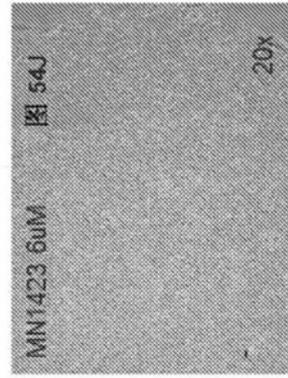
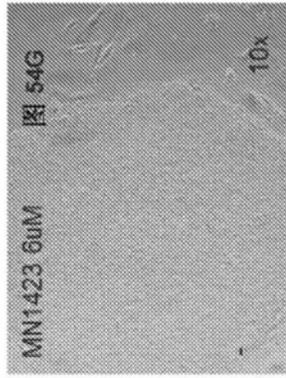
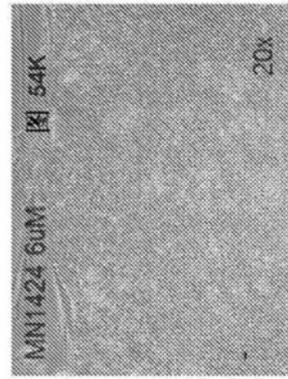
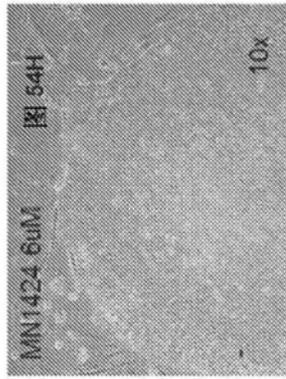
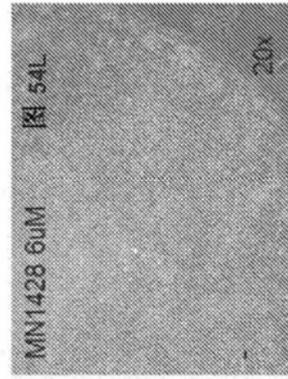
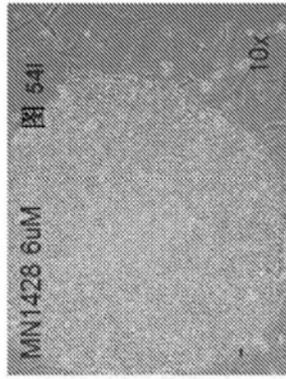
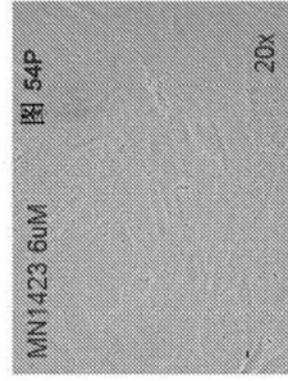
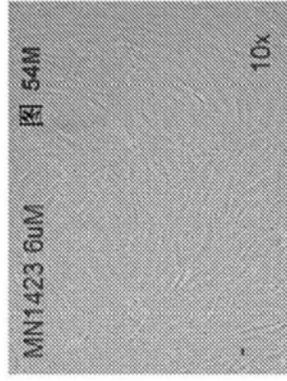
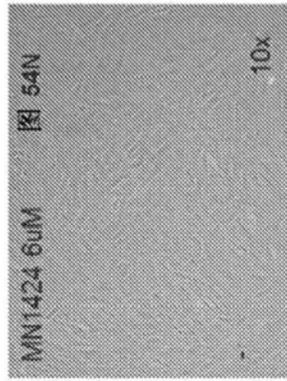


图54A-54F

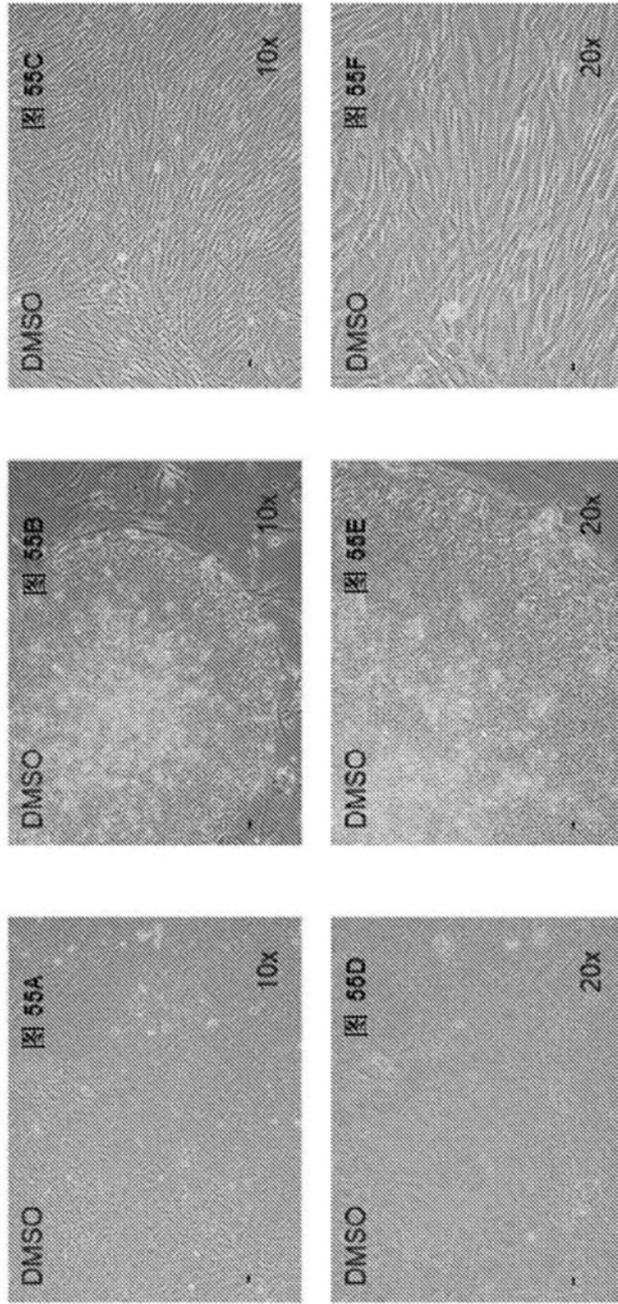
始发干细胞



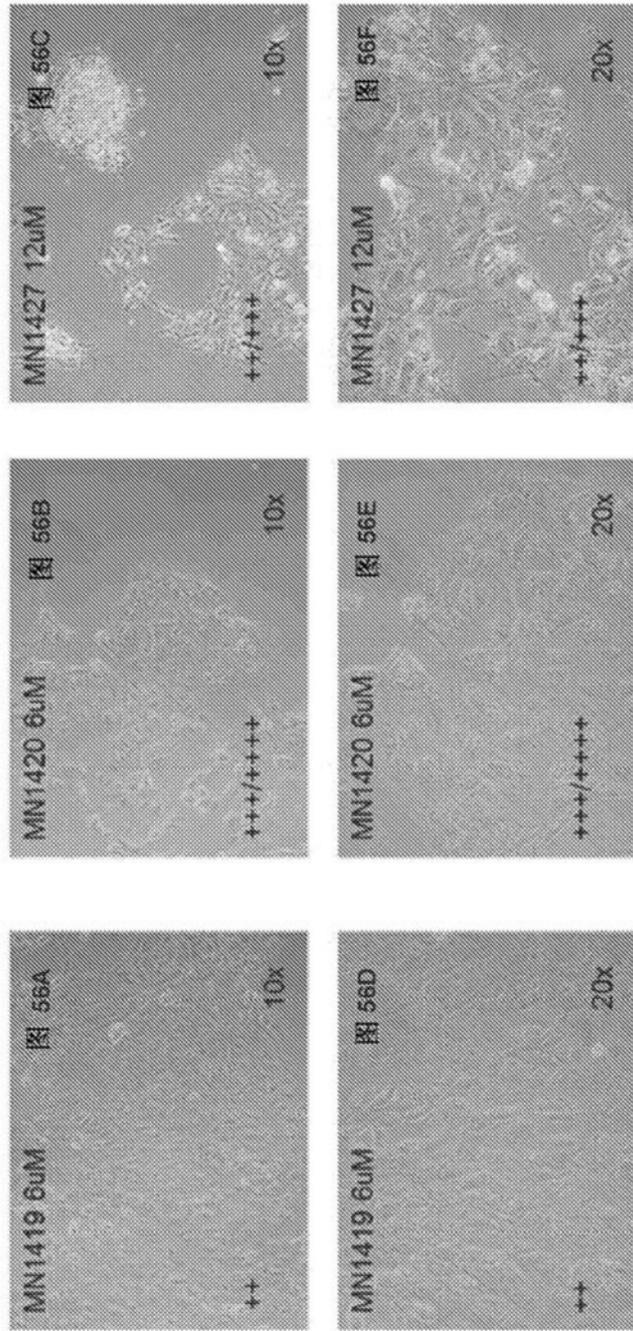
成纤维细胞



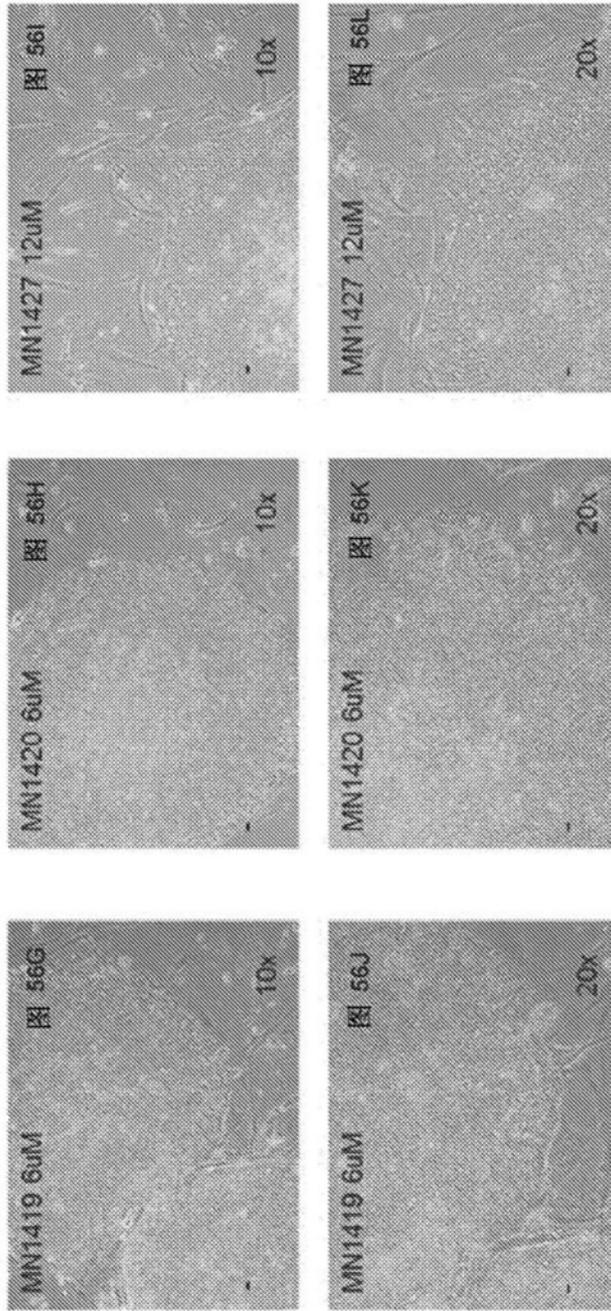
干细胞对照:



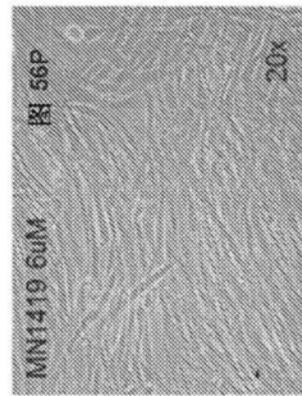
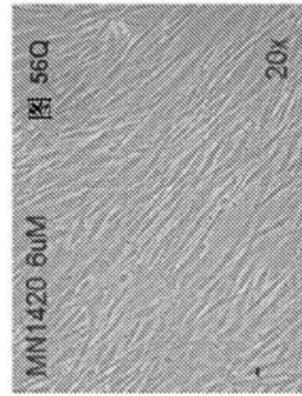
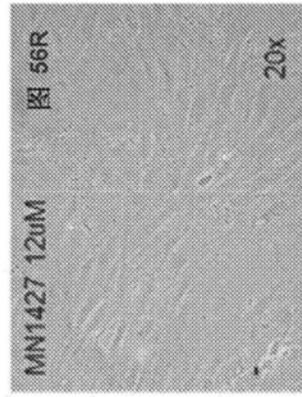
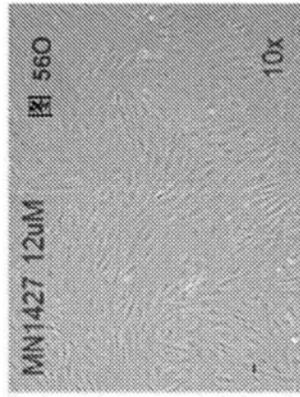
幼稚干细胞



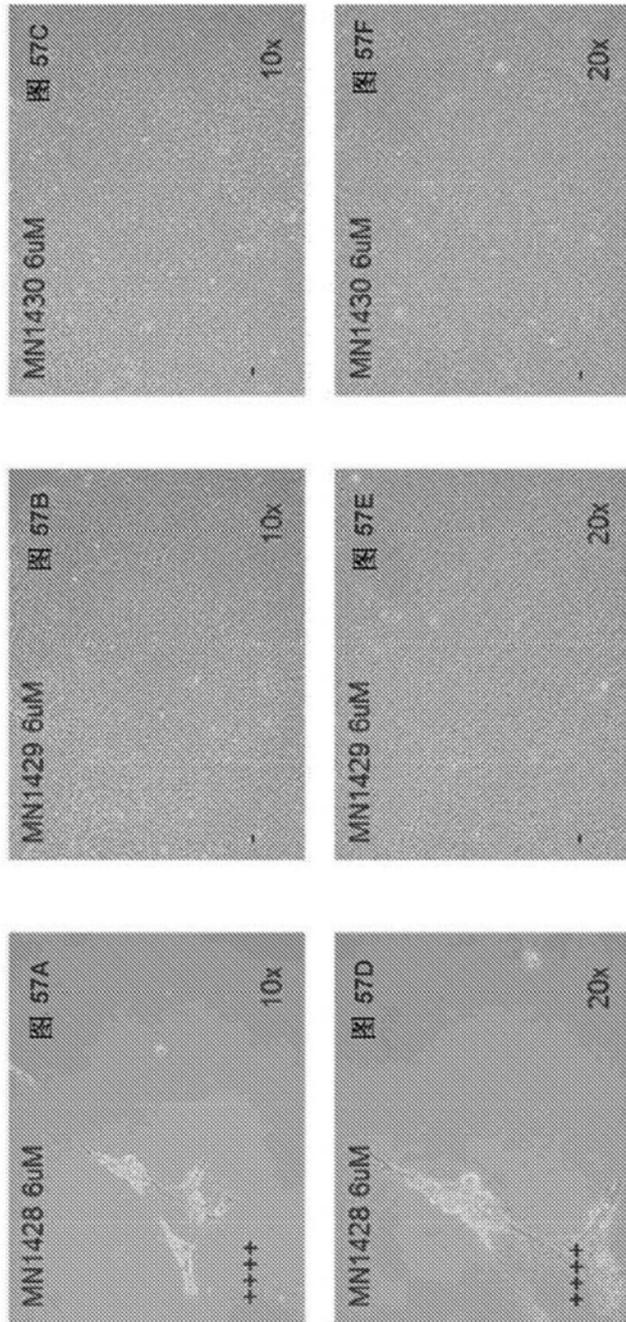
始发干细胞



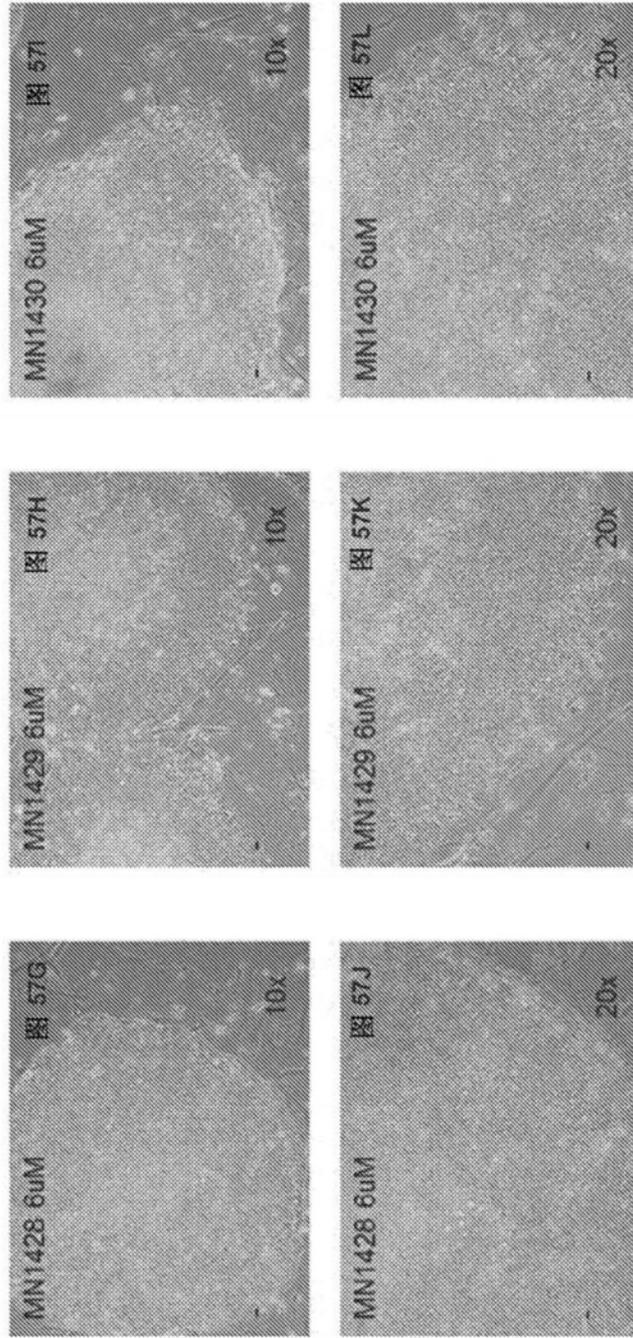
成纤维细胞



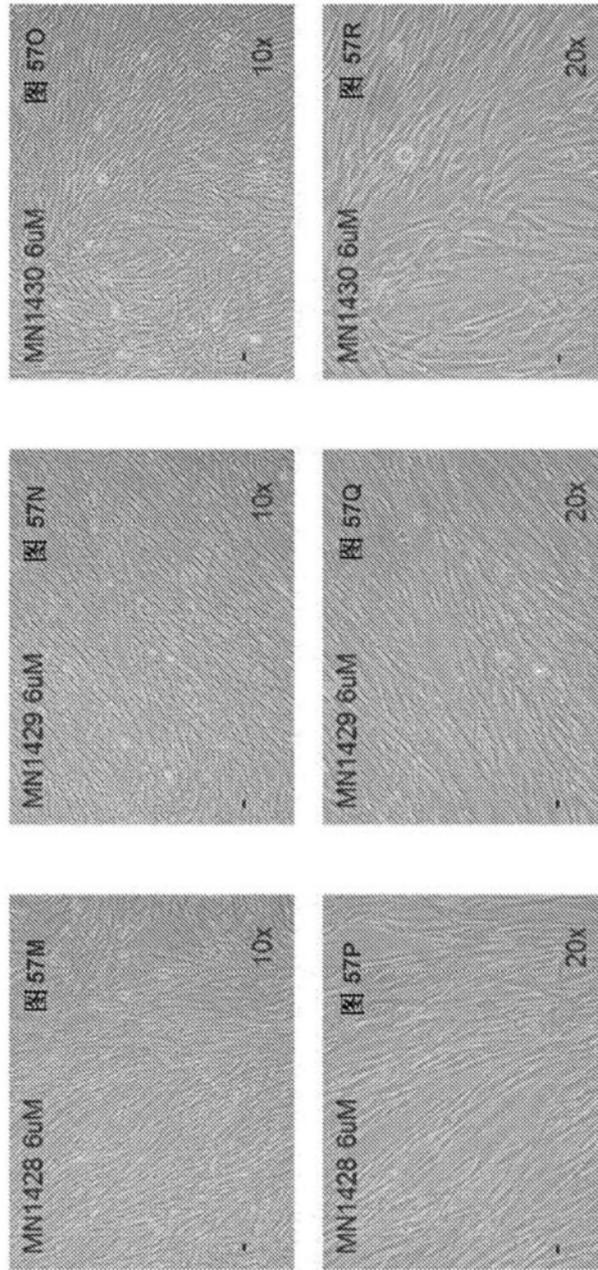
幼稚干细胞



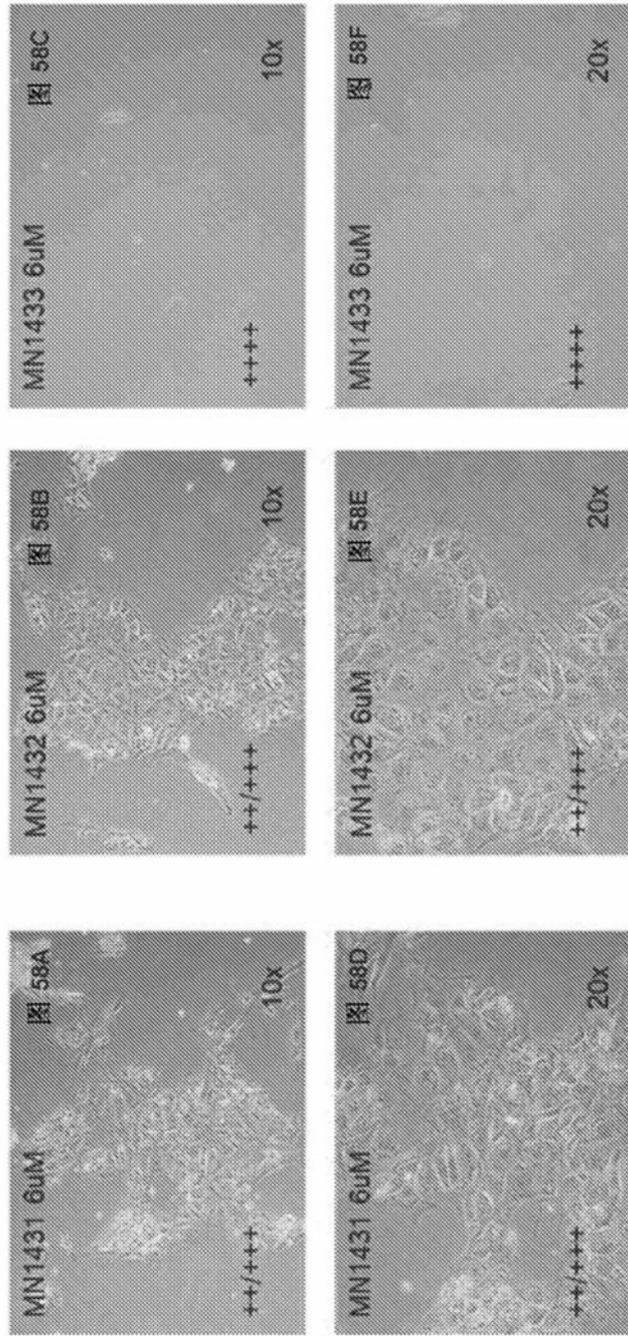
始发干细胞



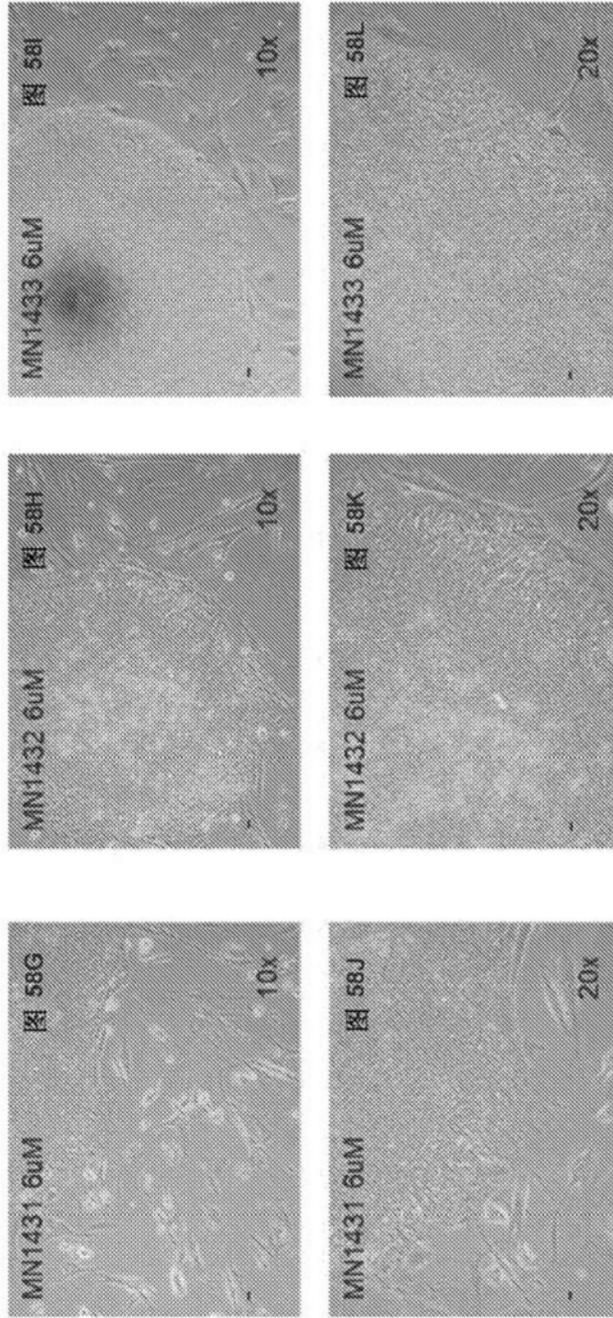
成纤维细胞



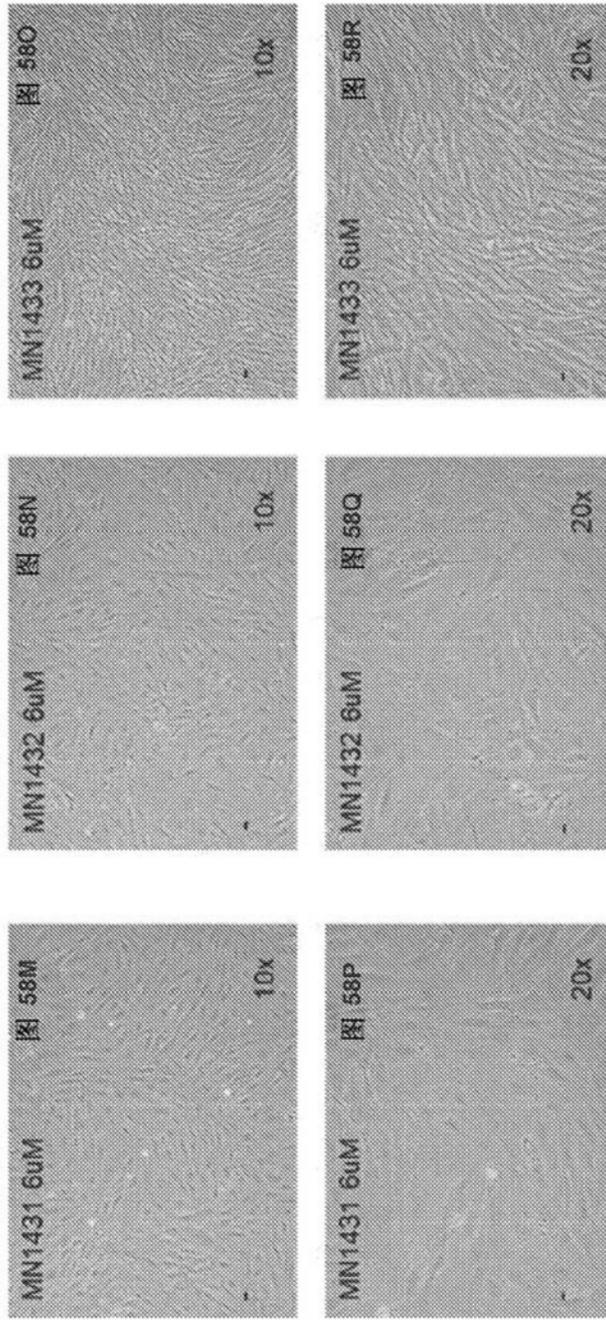
幼稚干细胞



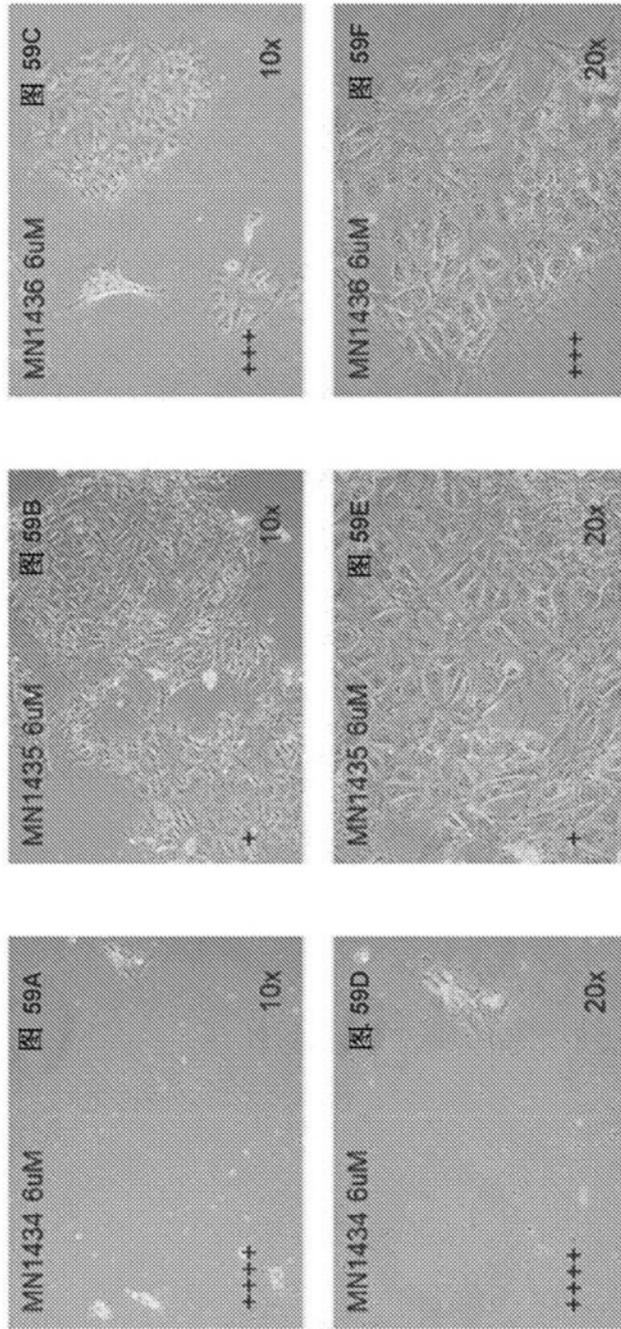
始发干细胞



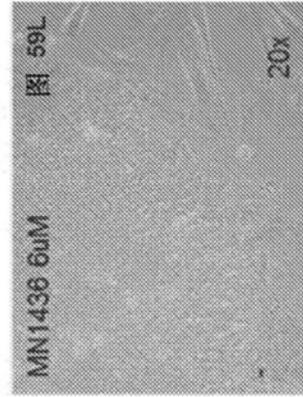
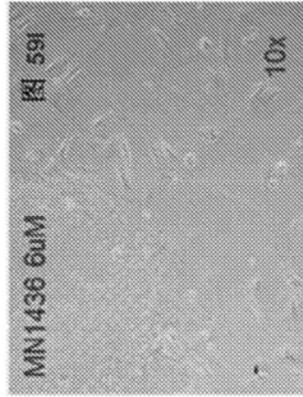
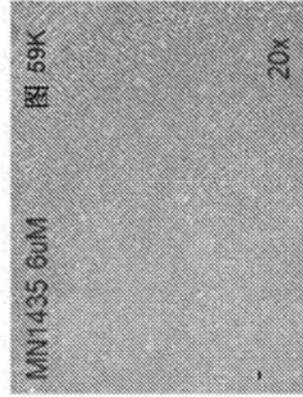
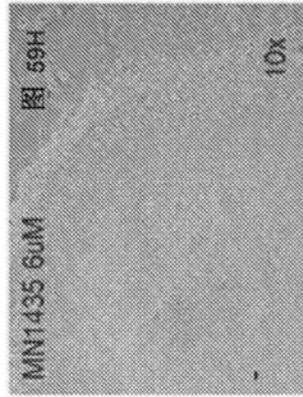
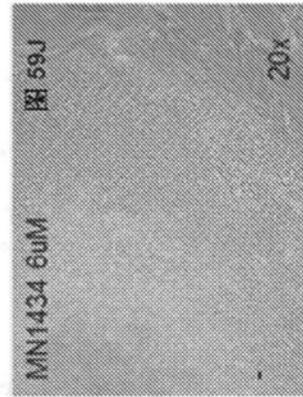
成纤维细胞



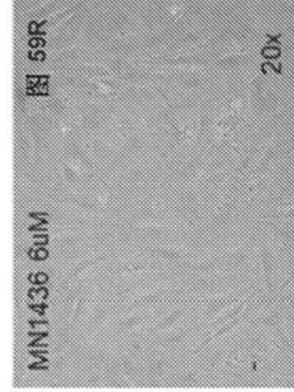
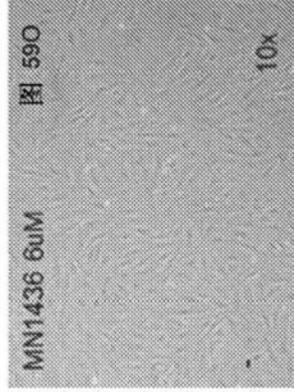
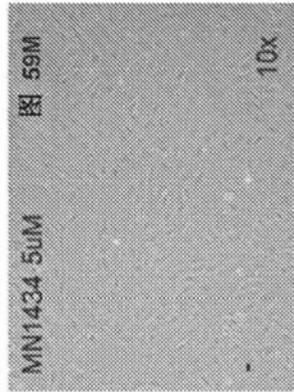
幼稚干细胞



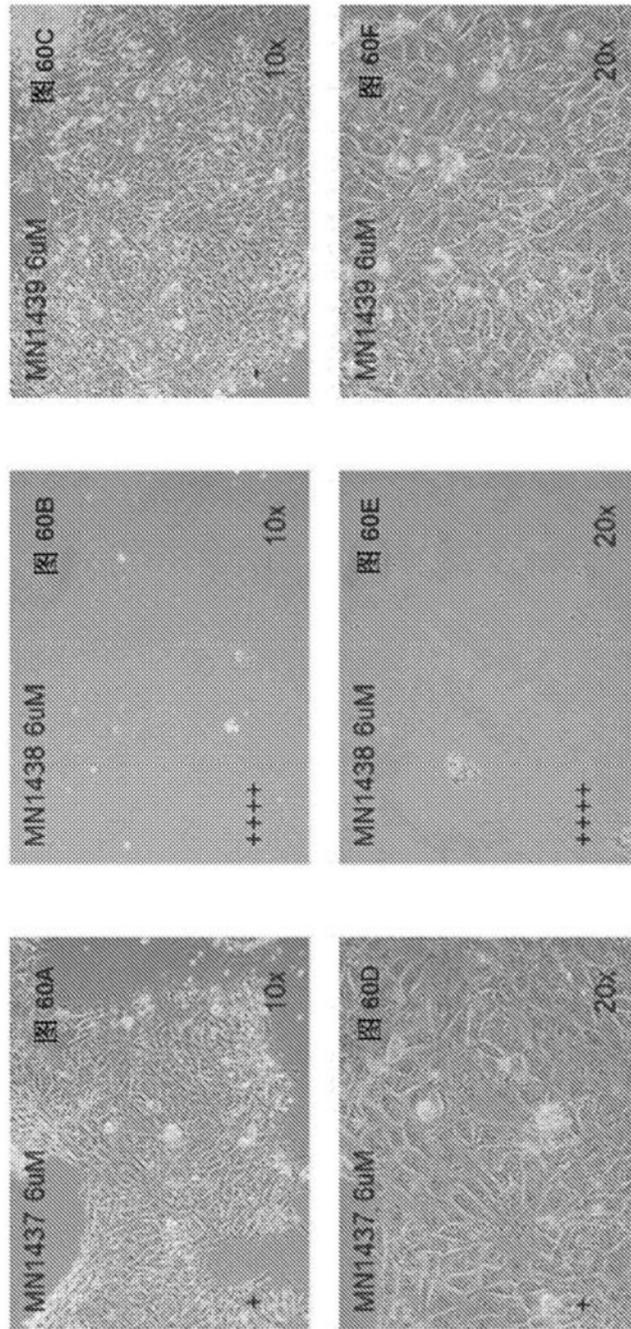
始发干细胞



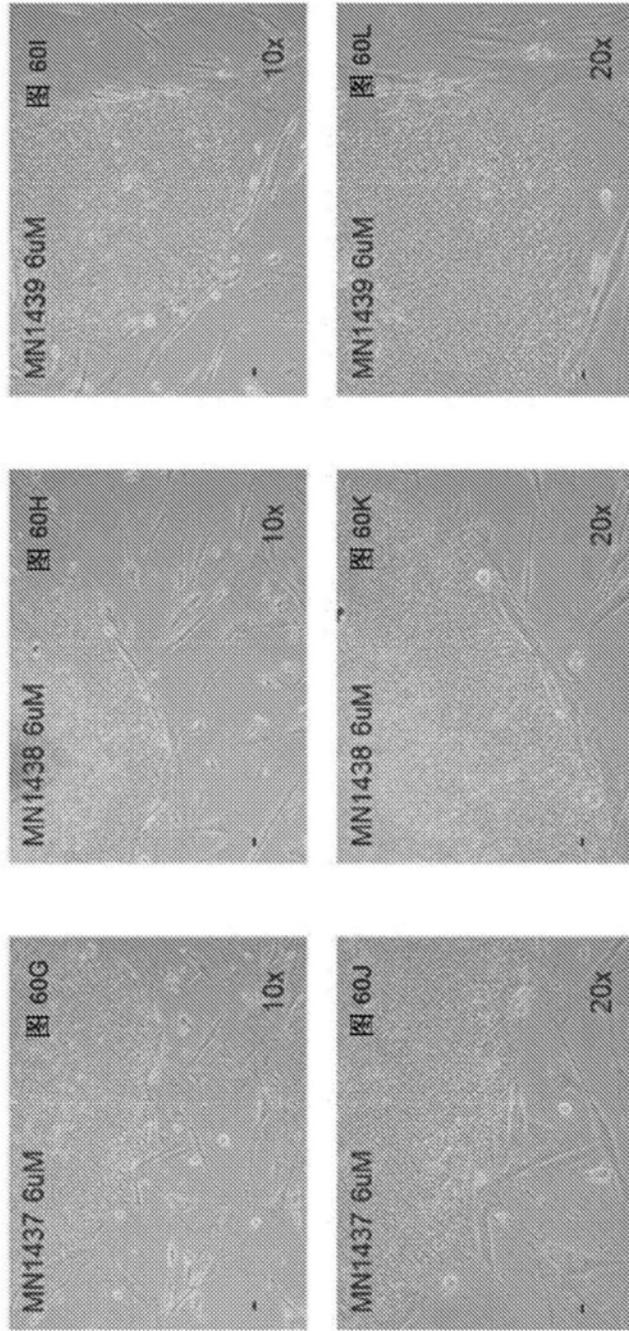
成纤维细胞



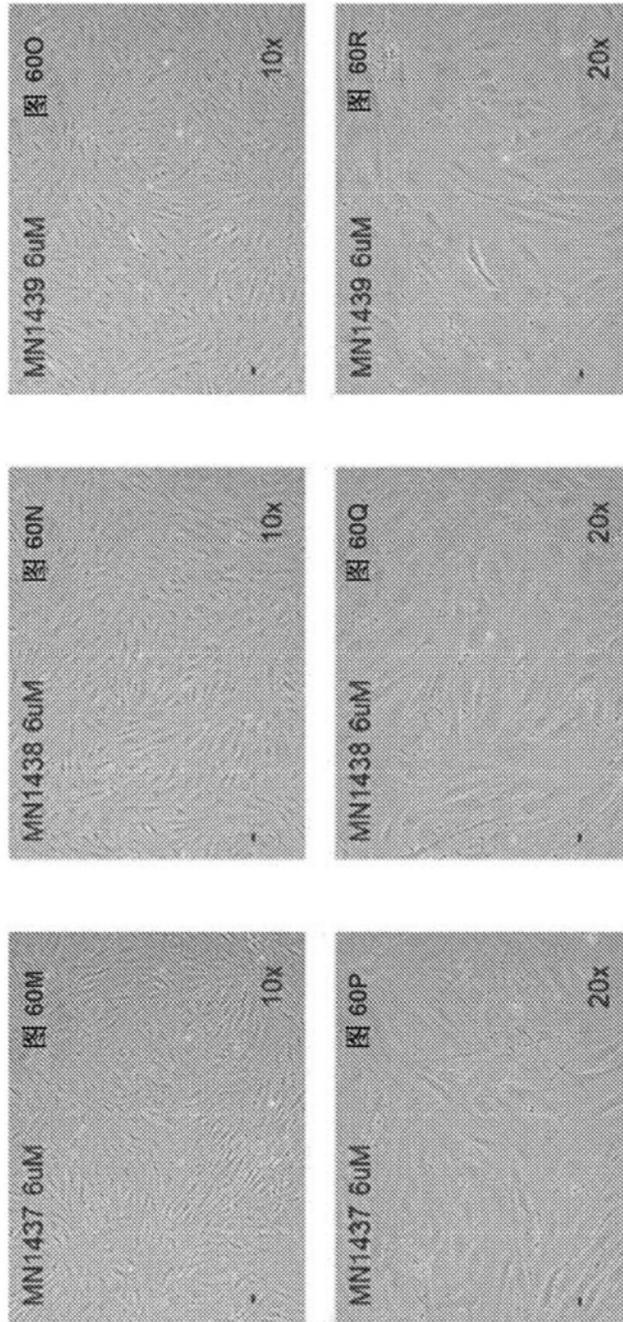
幼稚干细胞



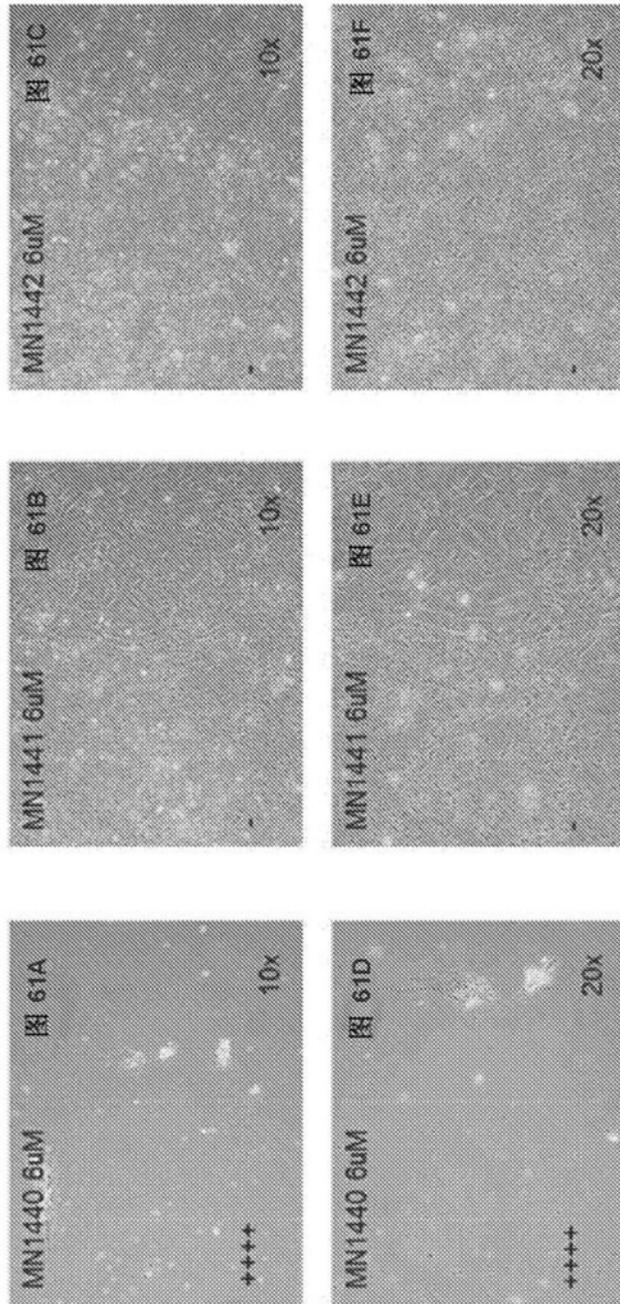
始发干细胞



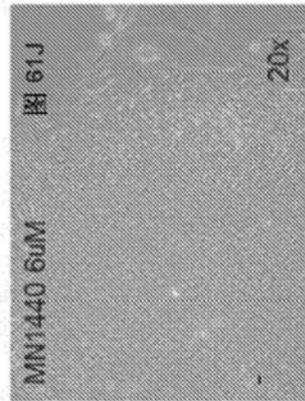
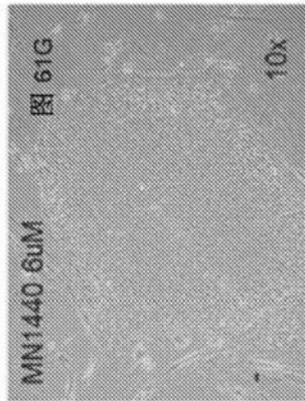
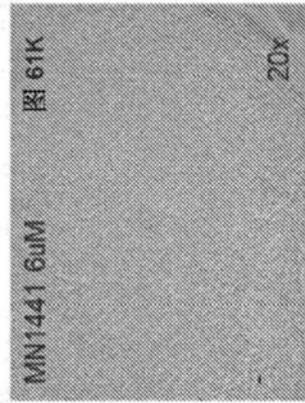
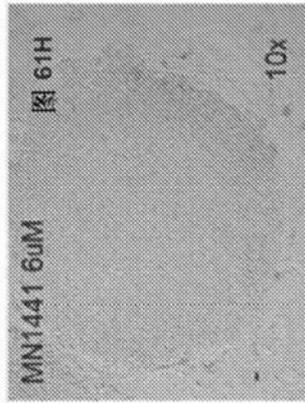
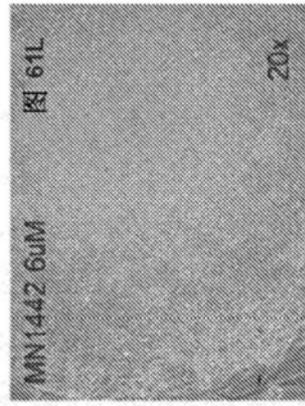
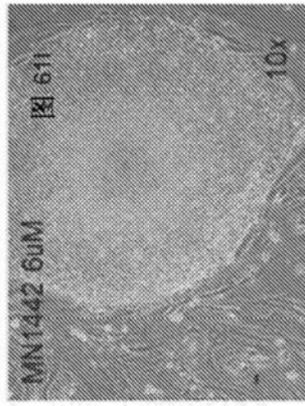
成纤维细胞



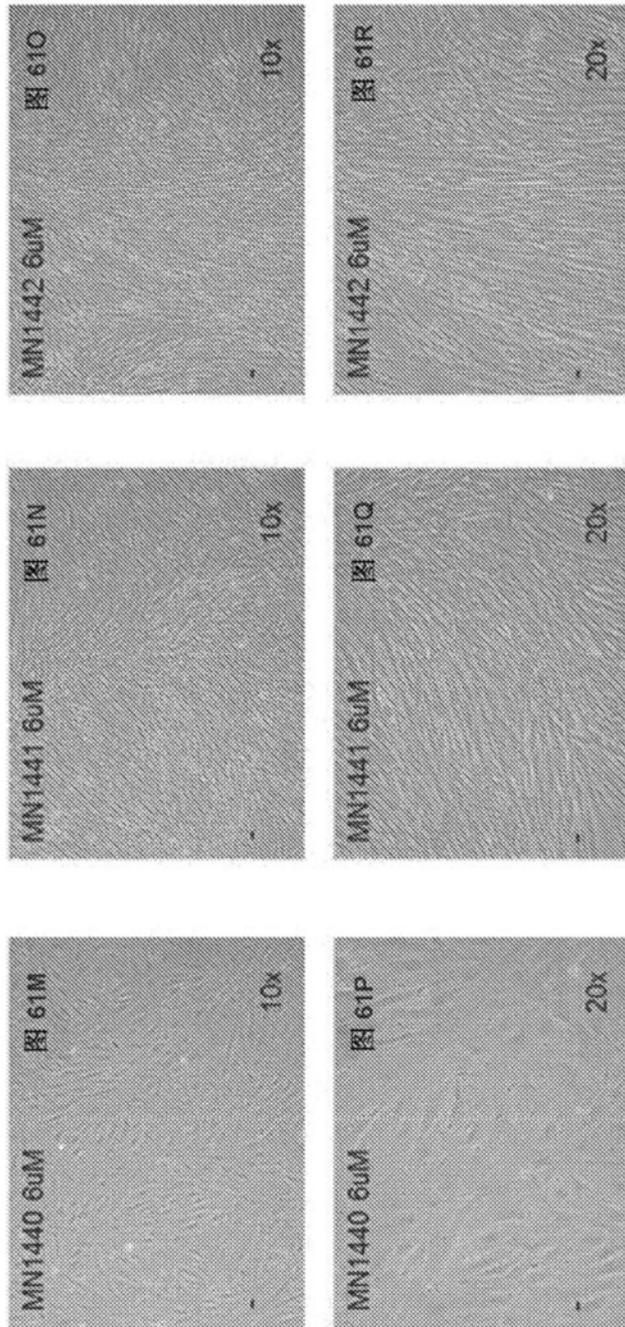
幼稚干细胞



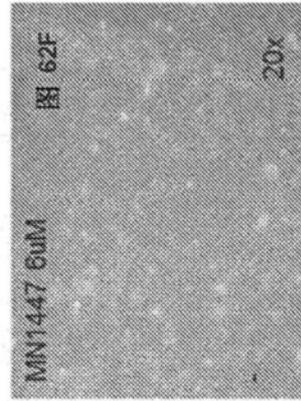
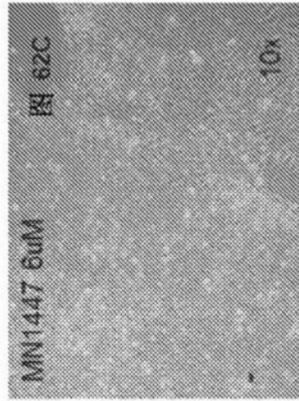
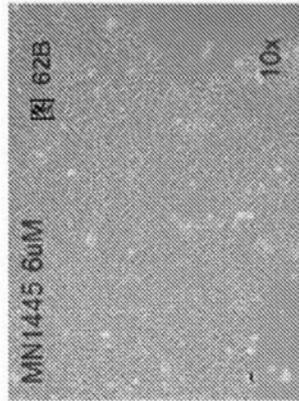
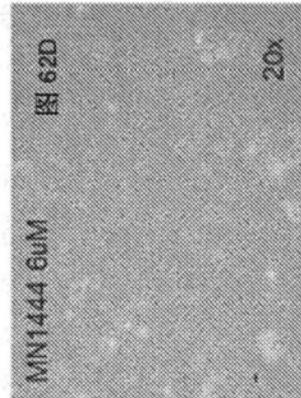
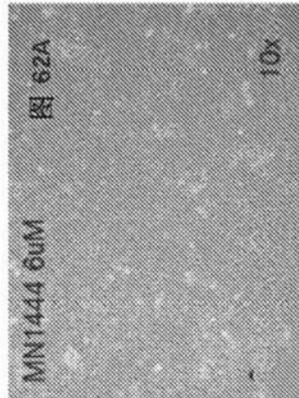
始发干细胞



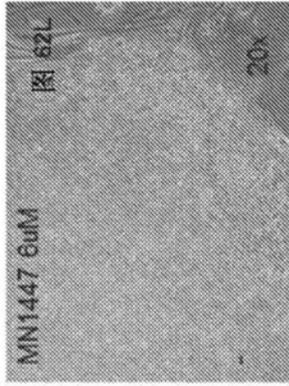
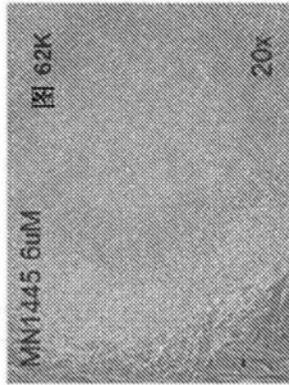
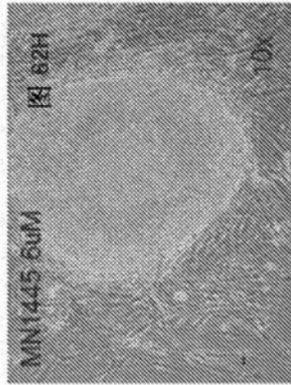
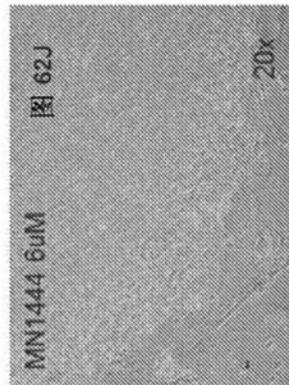
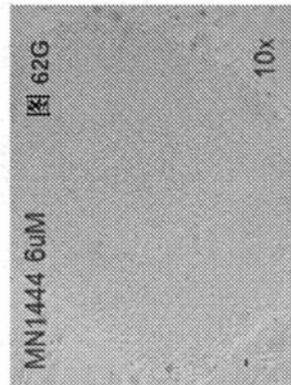
成纤维细胞



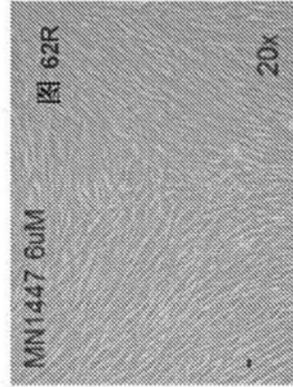
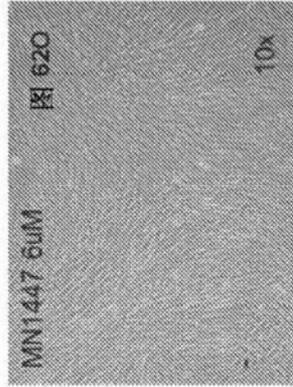
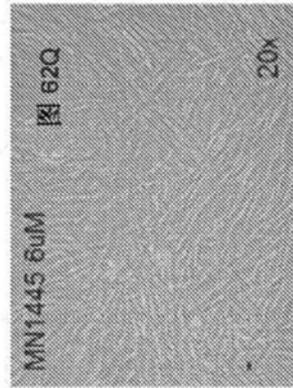
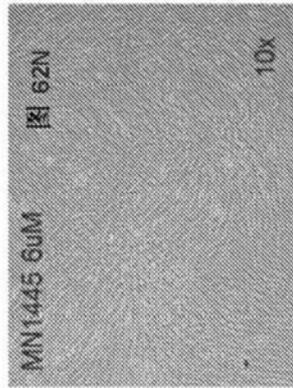
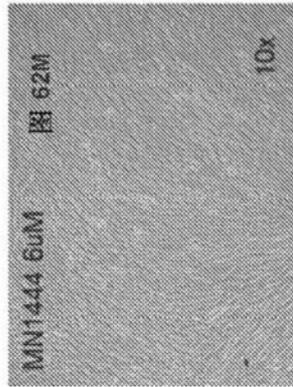
幼稚干细胞



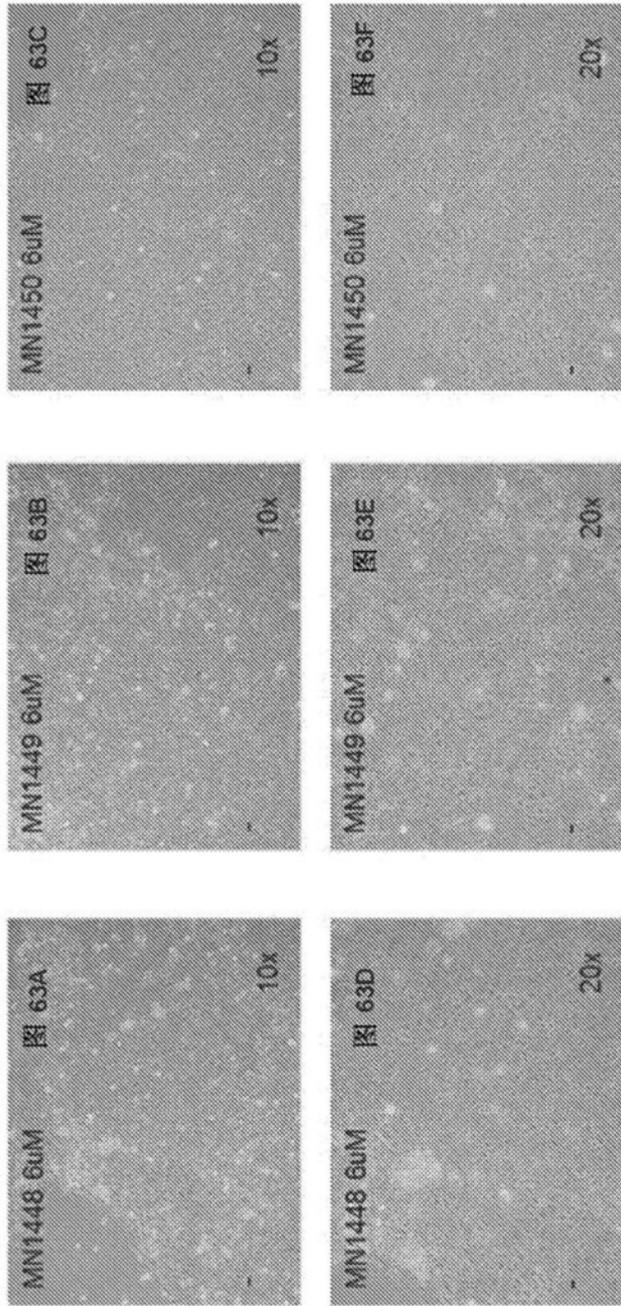
始发干细胞



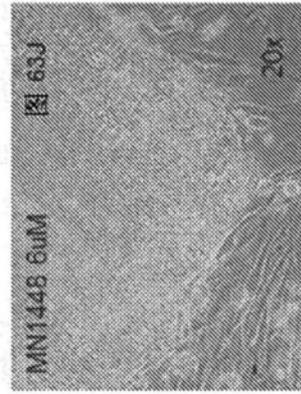
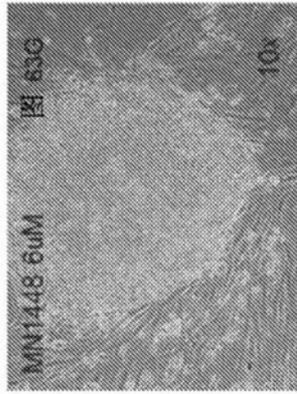
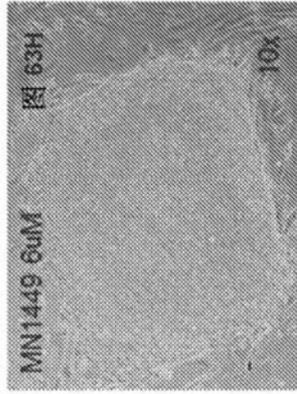
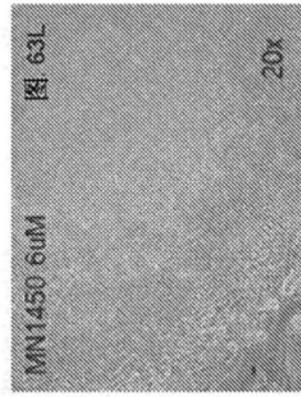
成纤维细胞



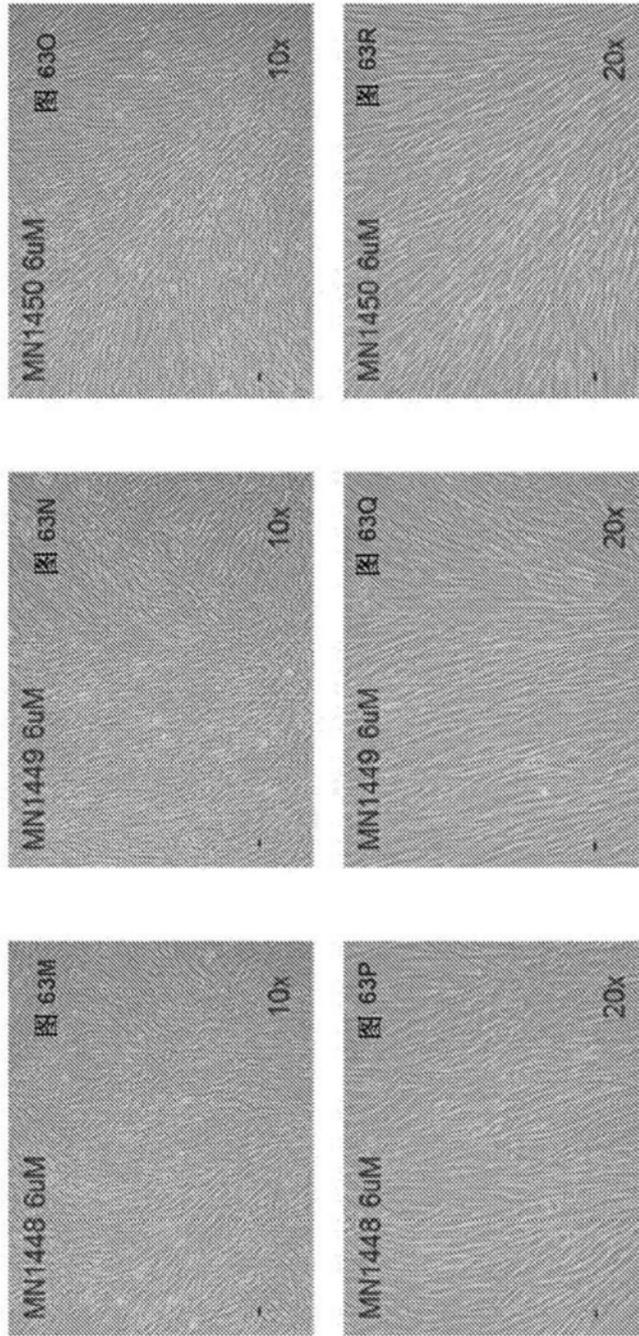
幼稚干细胞



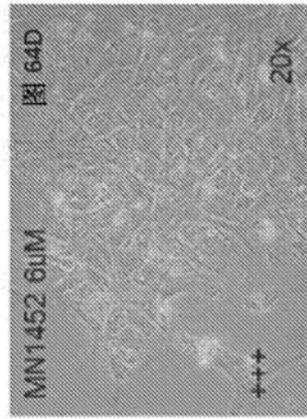
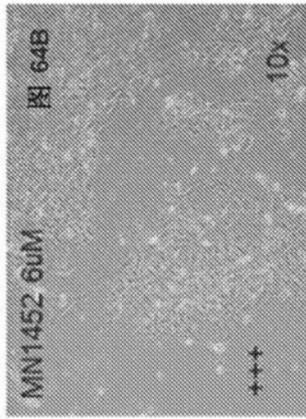
始发干细胞



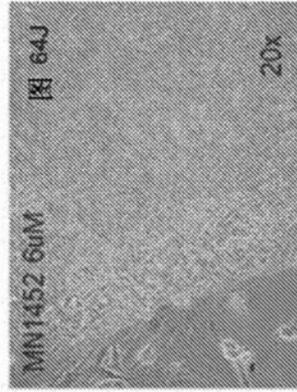
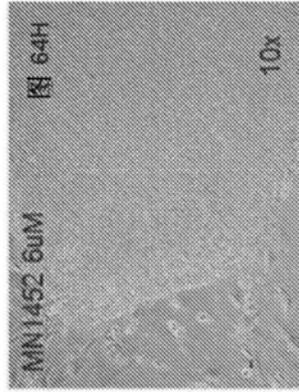
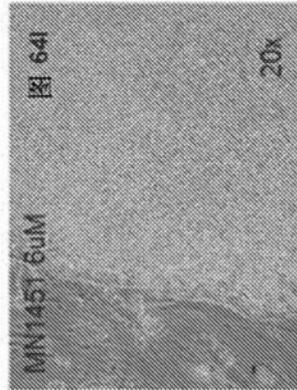
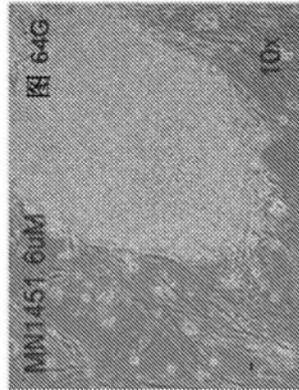
成纤维细胞



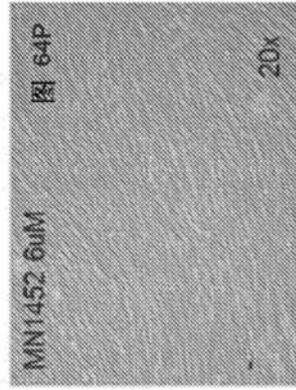
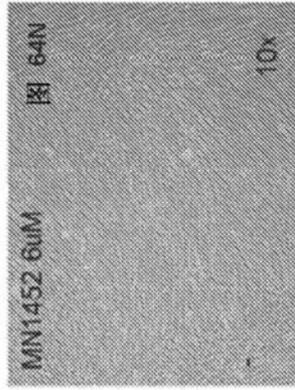
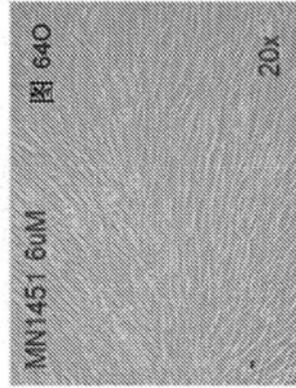
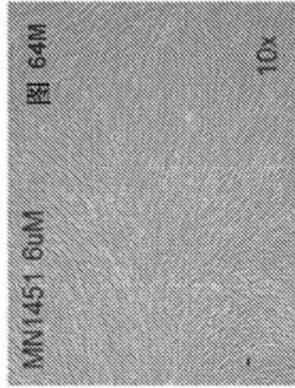
幼稚干细胞



始发干细胞



成纤维细胞



图NC11癌症迁移T47D@120hr

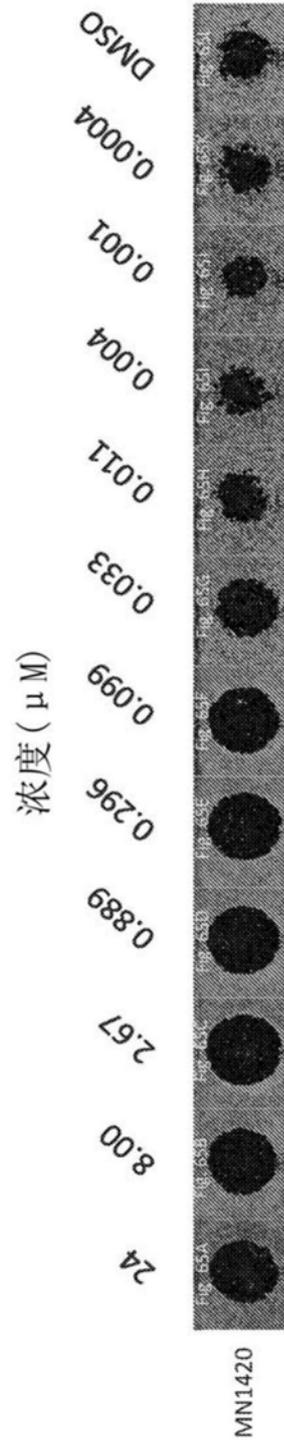


图65

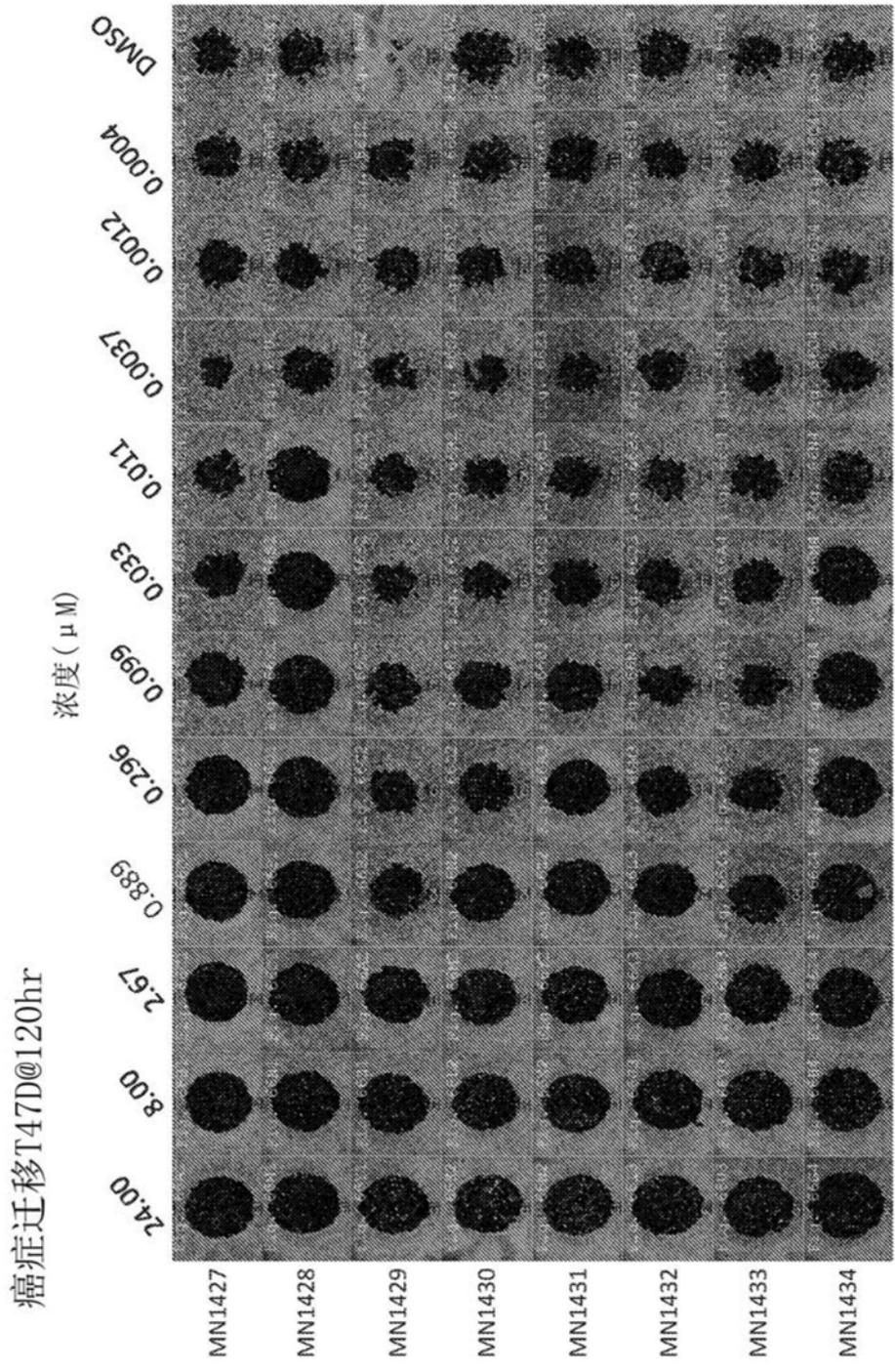


图66

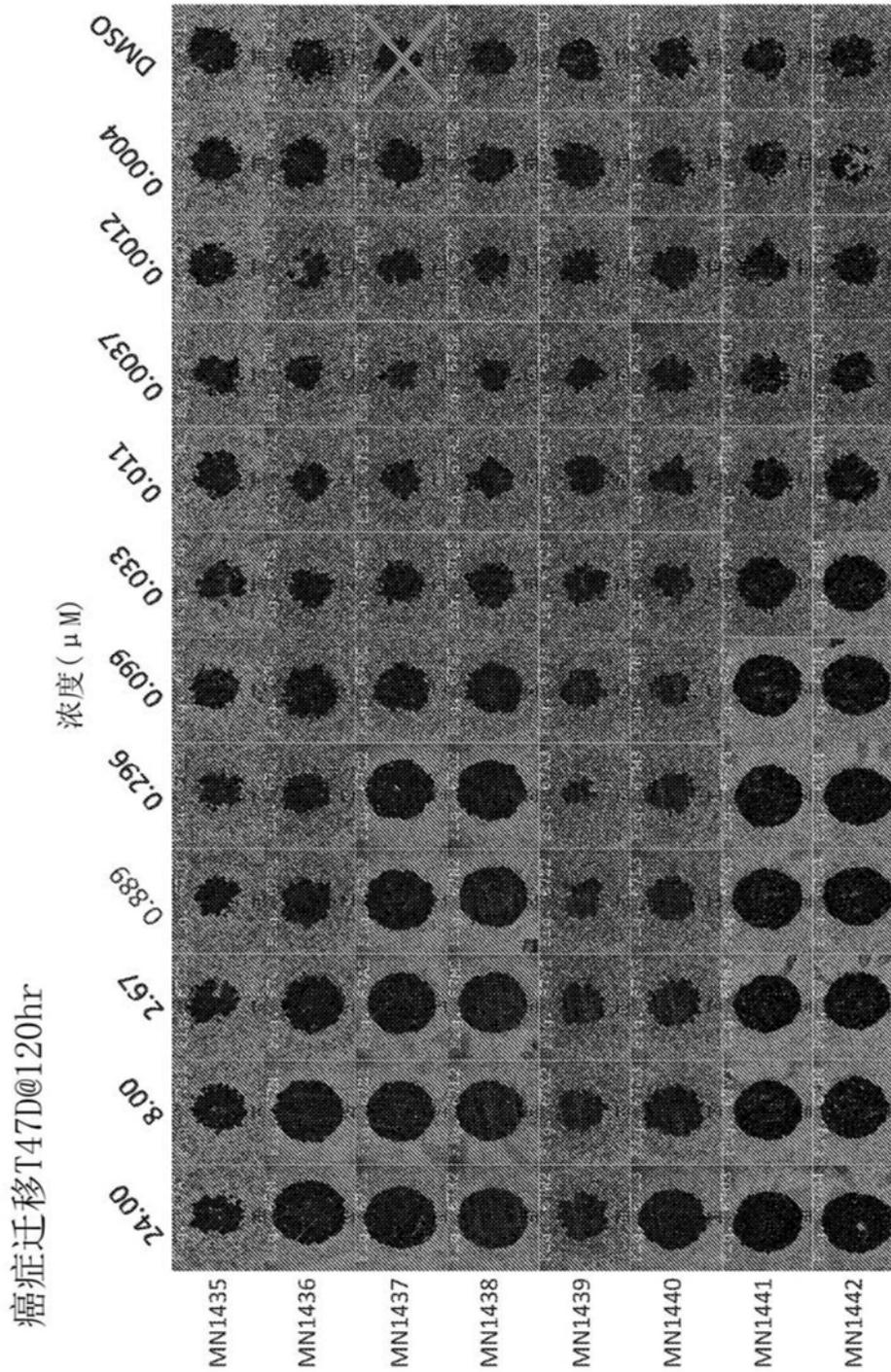


图67

癌症迁移T47D@120hr

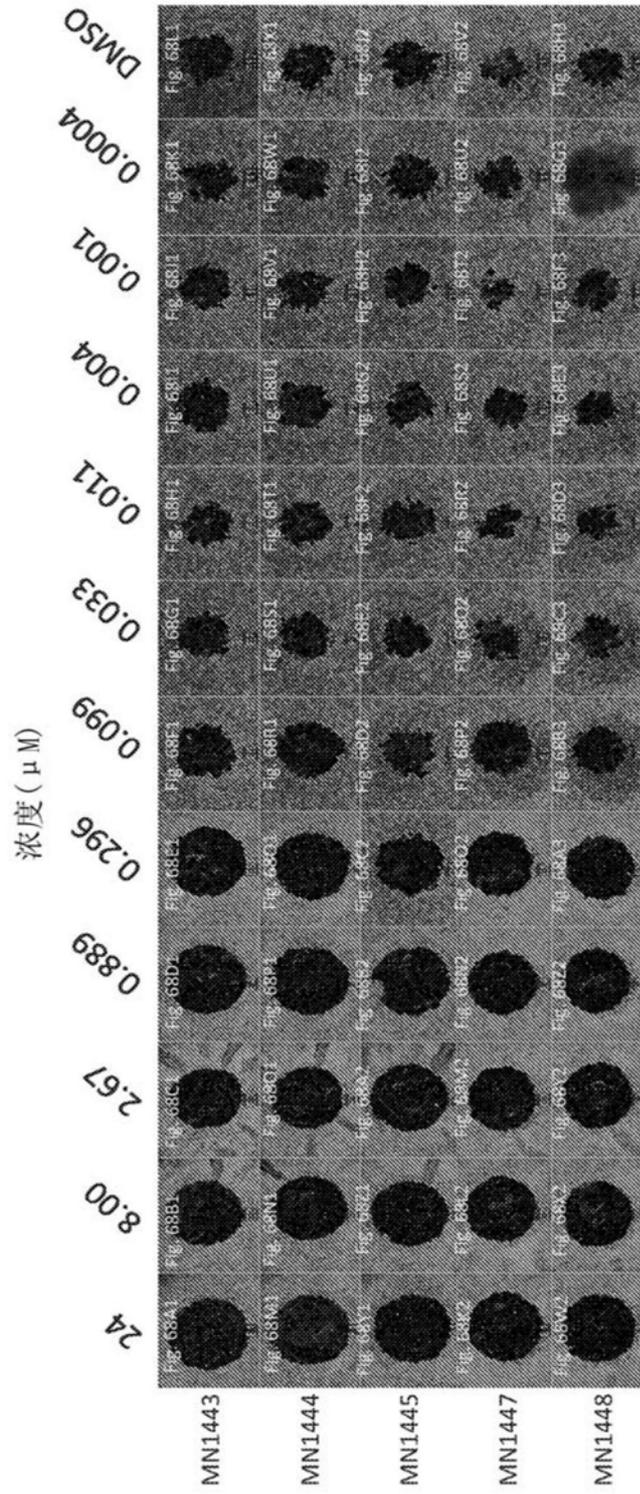


图68

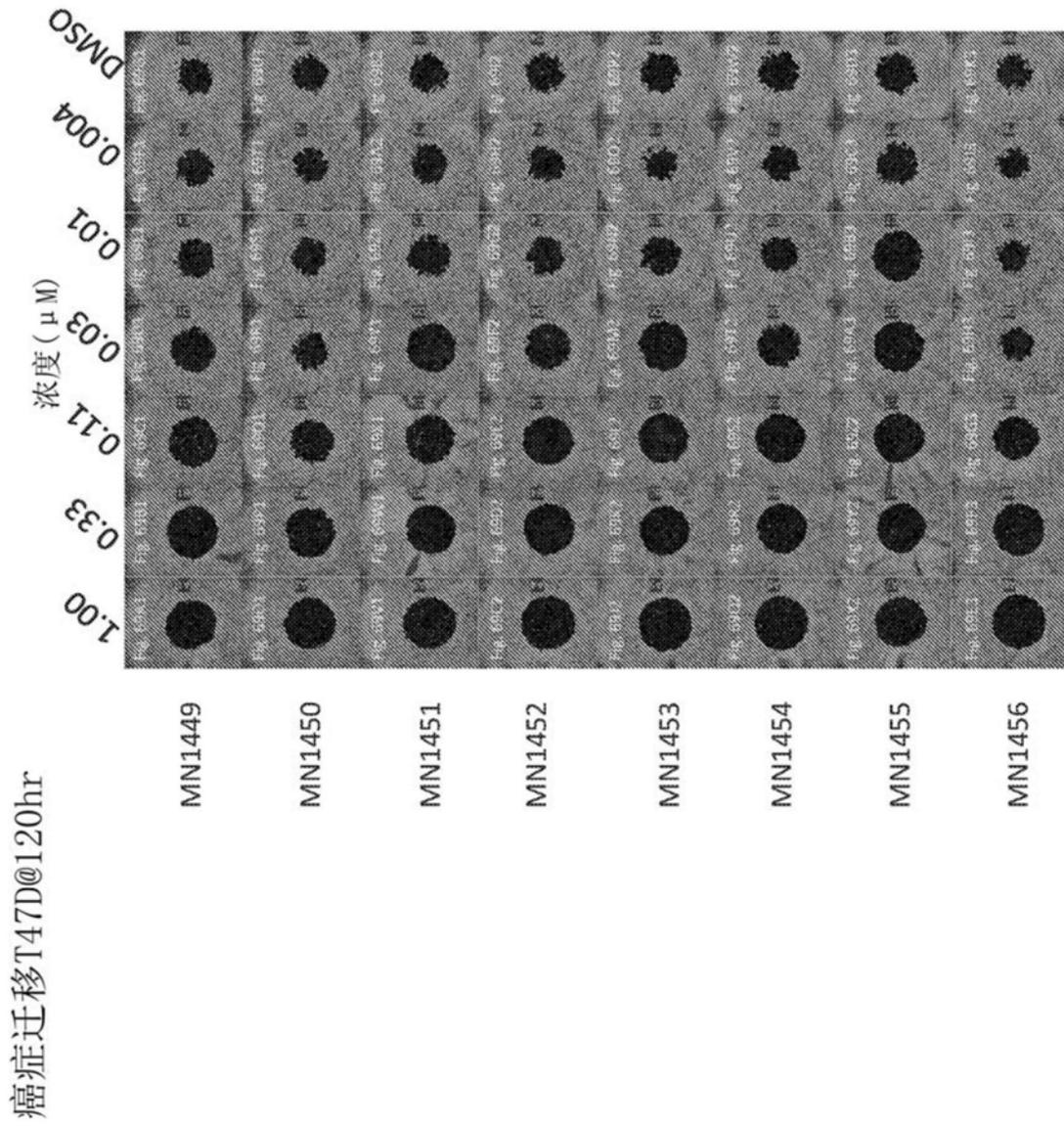


图69

癌症迁移T47D@120hr

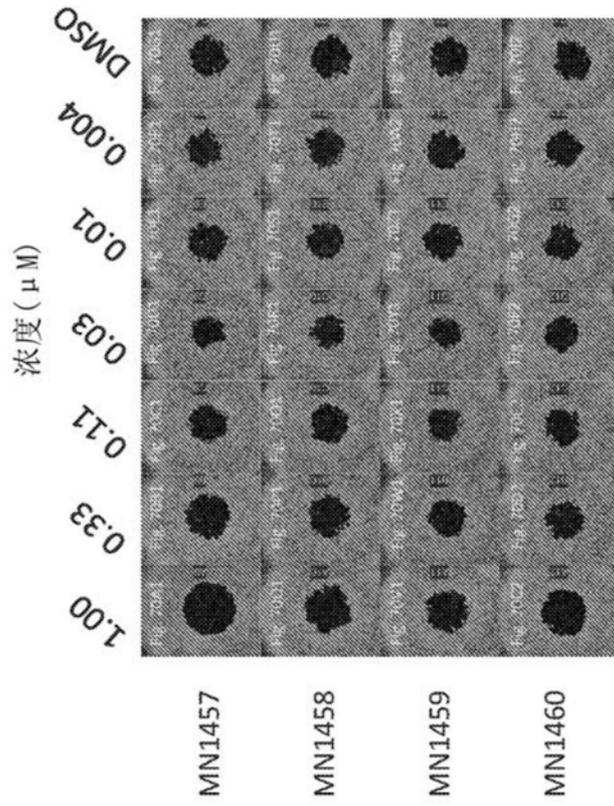


图70

图NC17癌症迁移T47D IC50@120hr

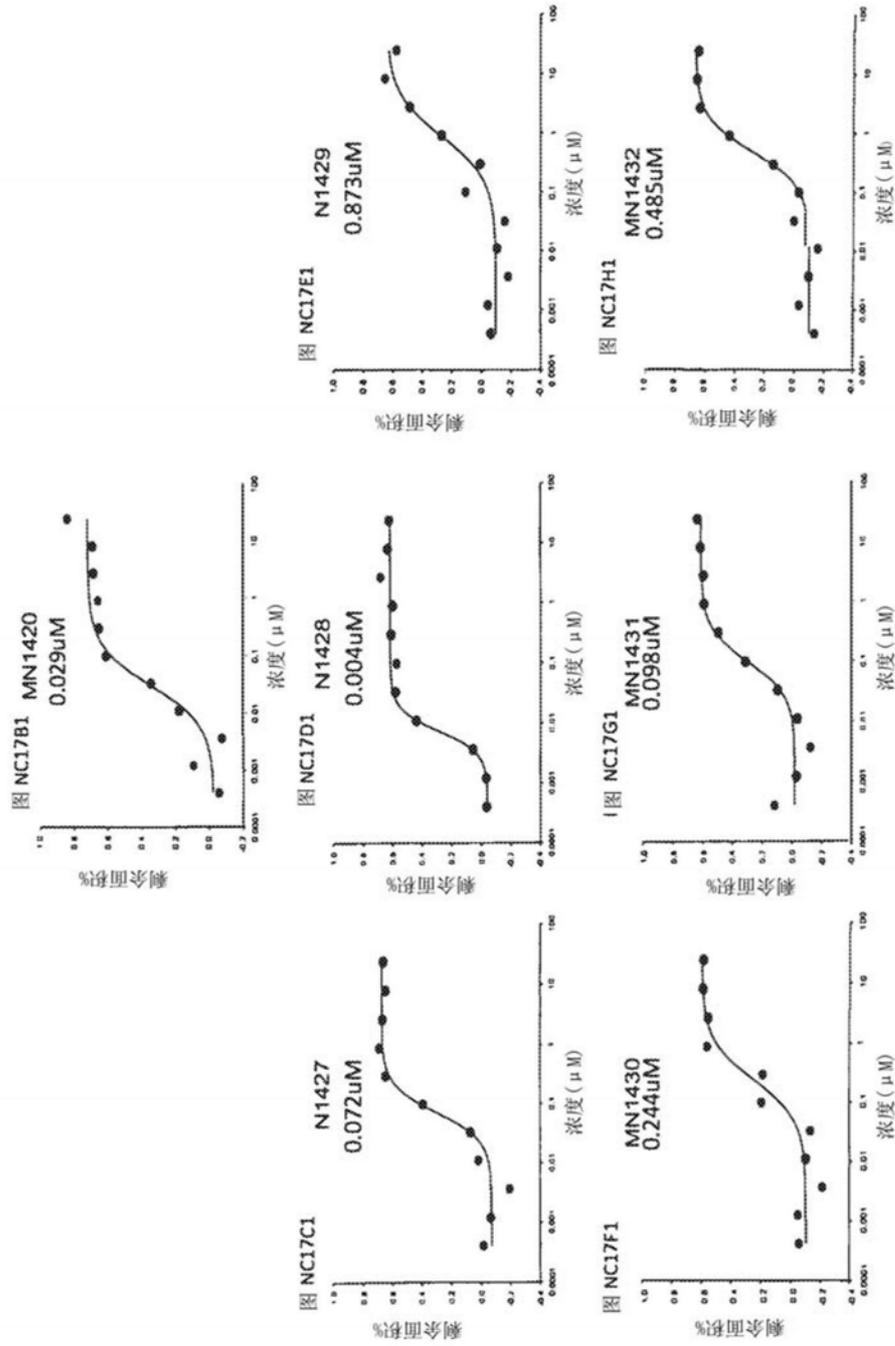


图71

图NC18癌症迁移T47D IC50@120hr

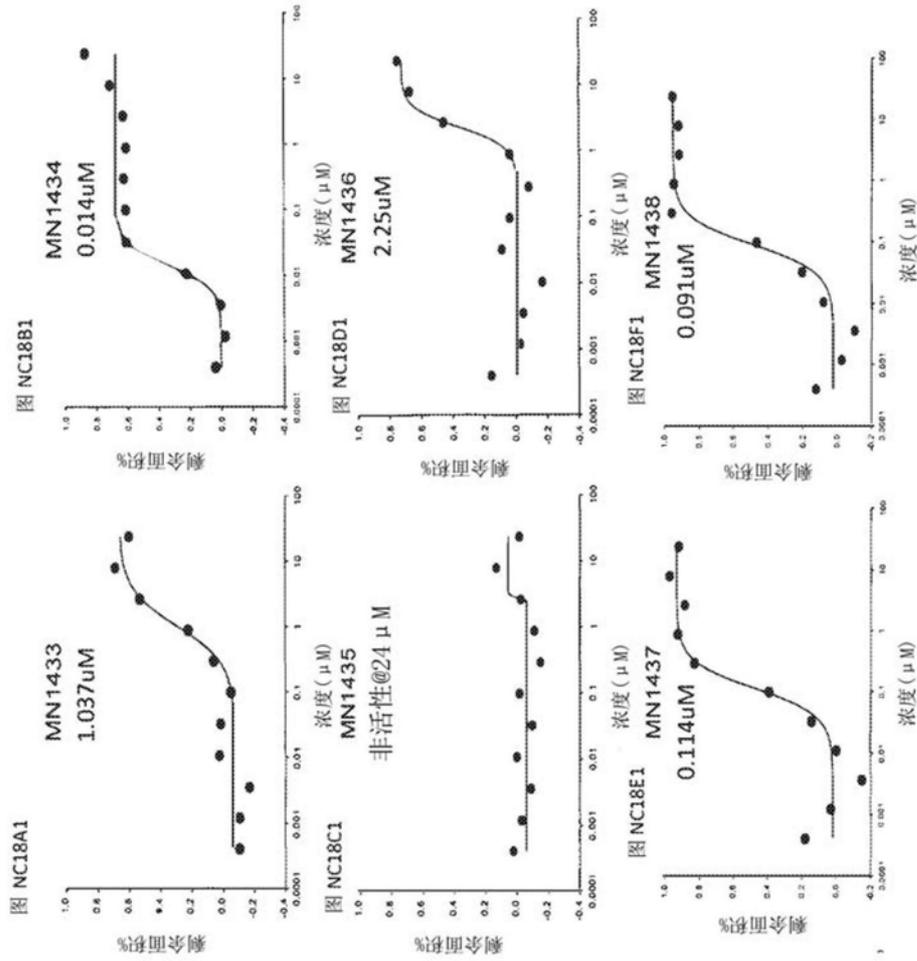


图72

图NC19癌症迁移T47D IC50@120hr

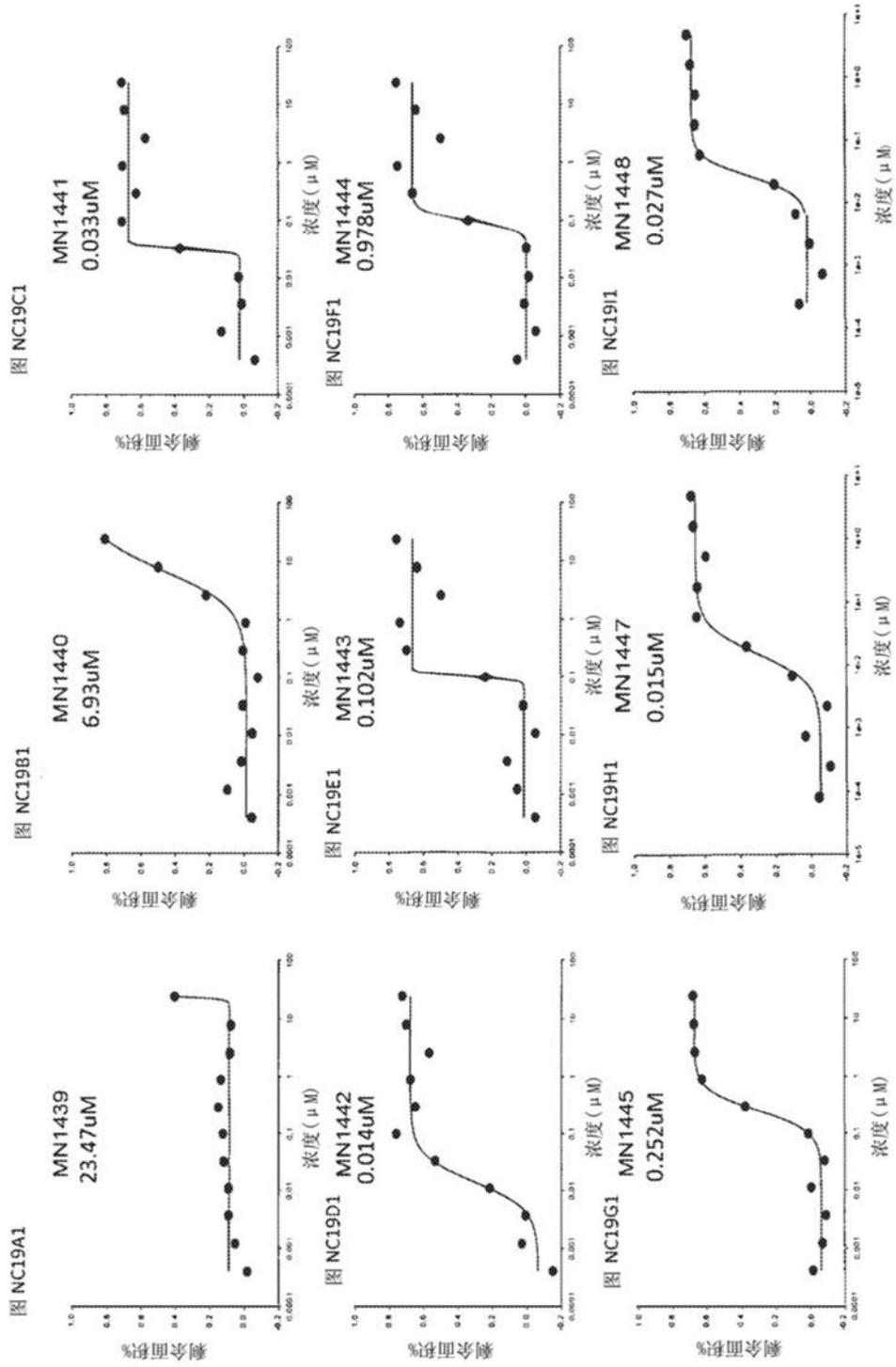


图73

图NC20癌症迁移T47D IC50@120hr

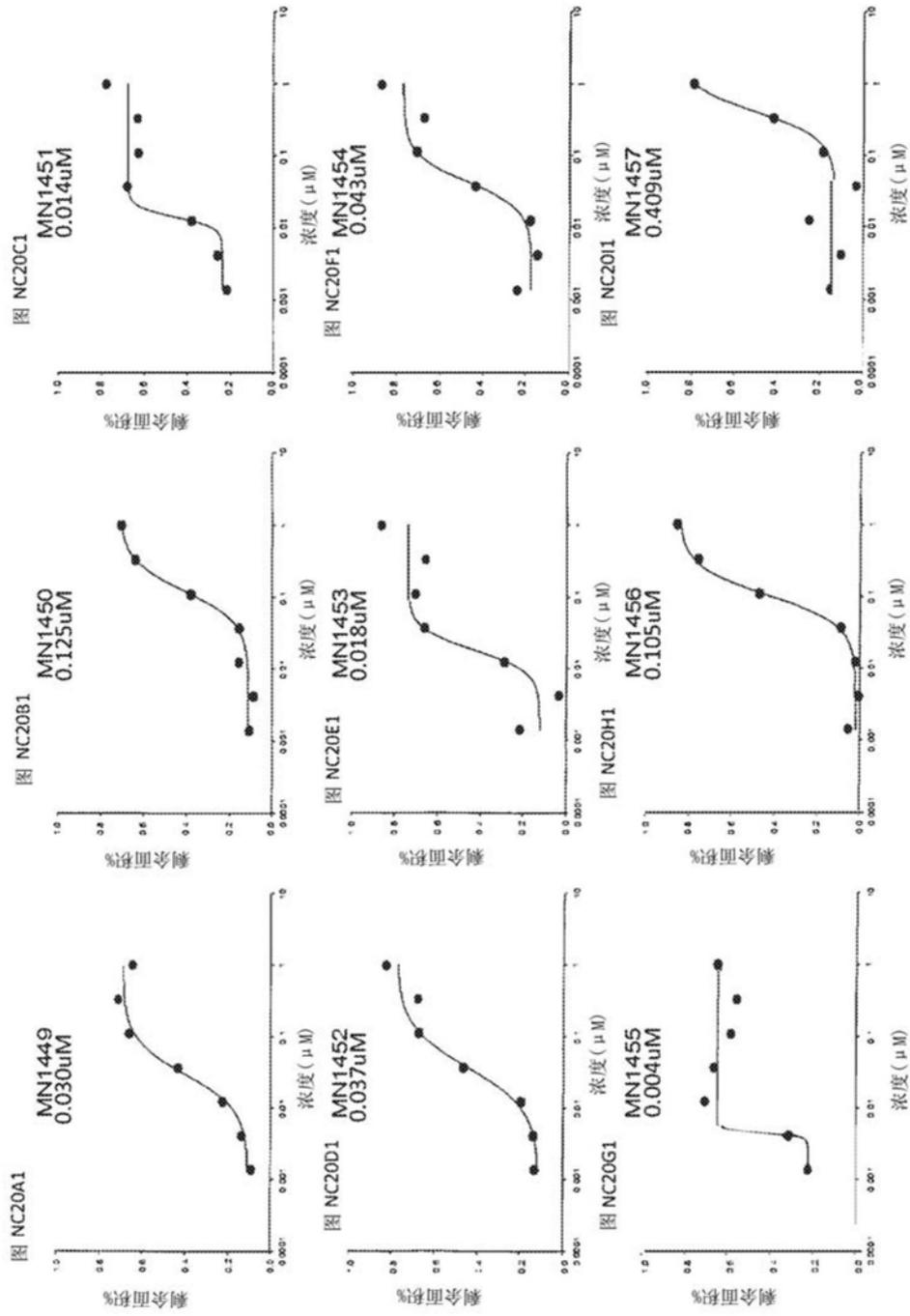


图74

图NC21癌症迁移T47D_IC50@120hr

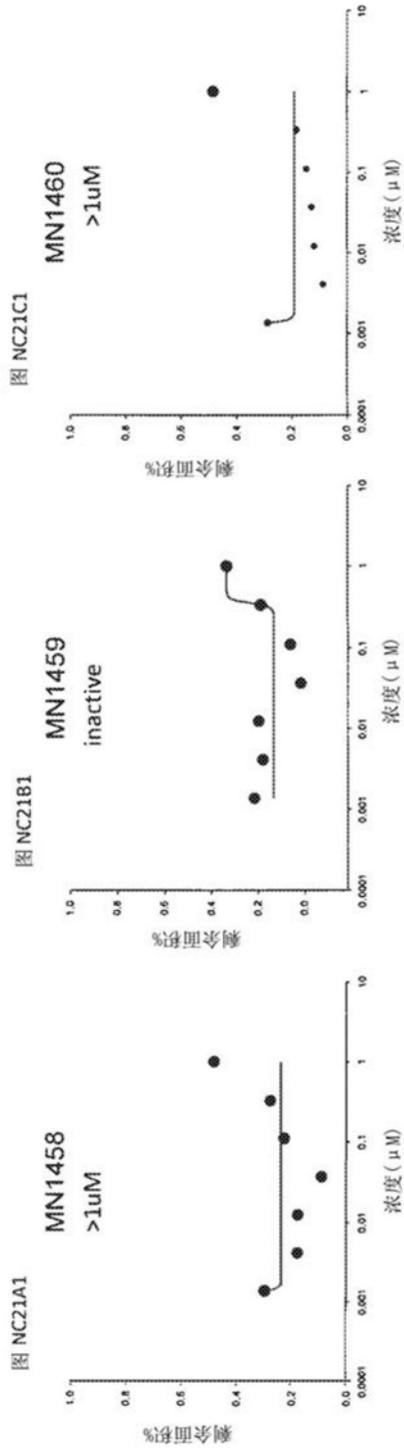


图75

加入指定浓度的化合物120hr后，抑制T47D癌细胞迁移

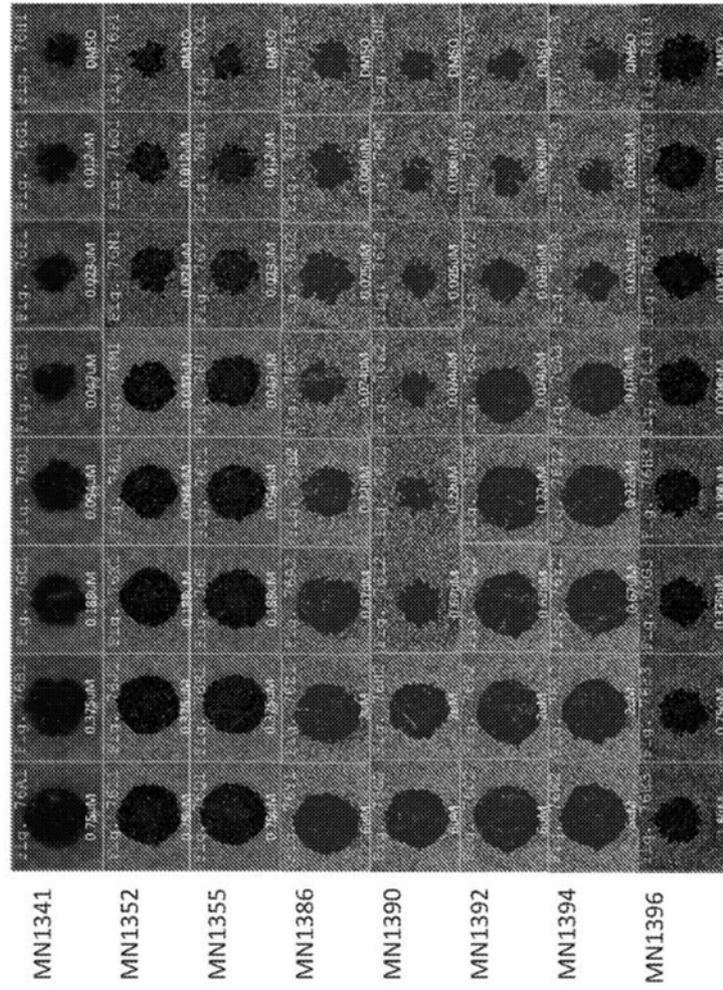


图76

加入指定浓度的化合物120h后，抑制T47D癌细胞迁移

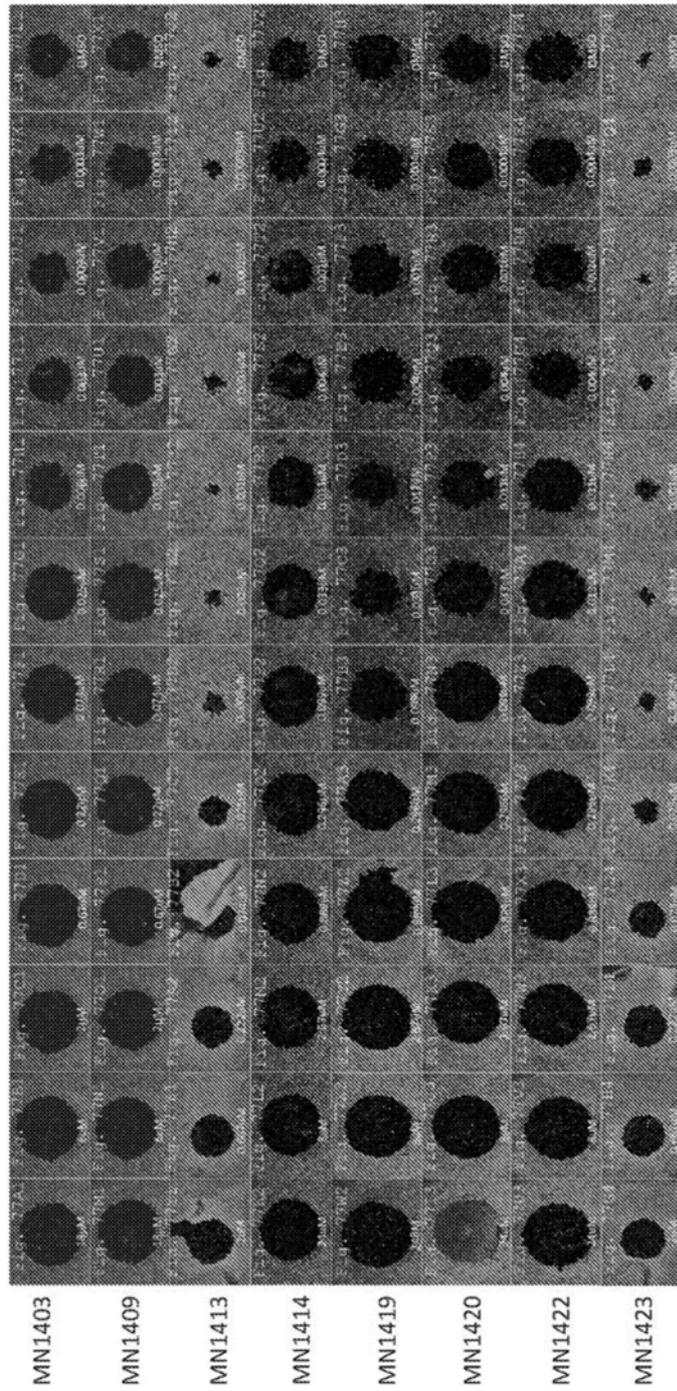


图77

加入指定浓度的化合物120hr后，抑制T47D癌细胞迁移

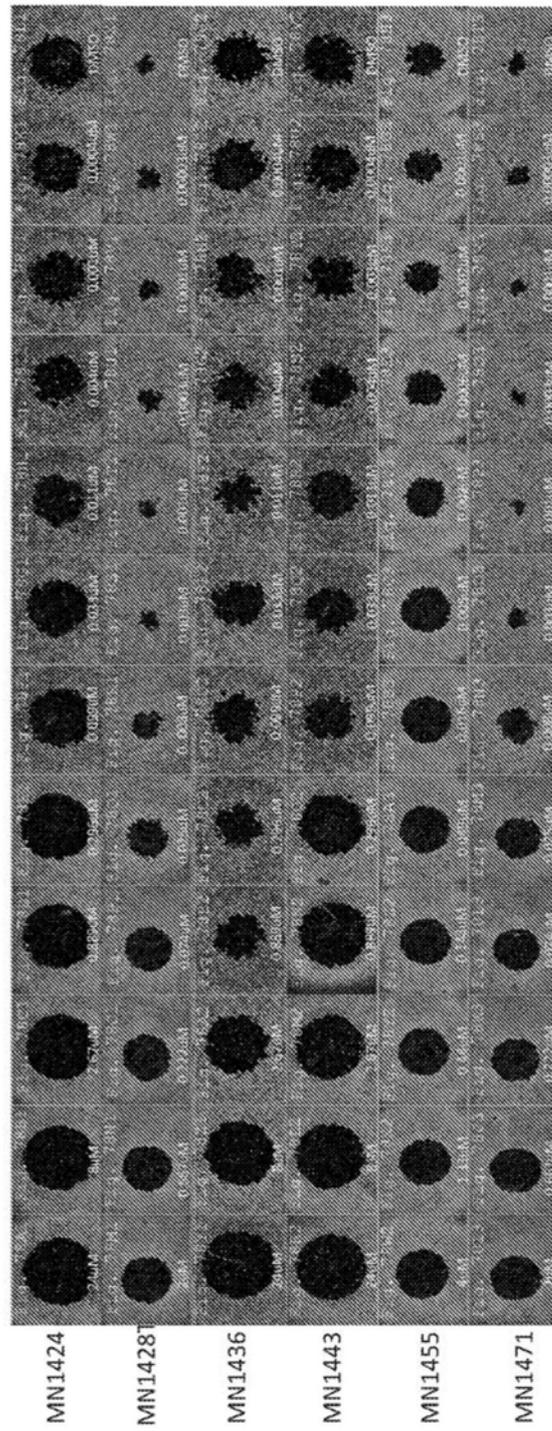


图78

120hr T47D迁移IC50值

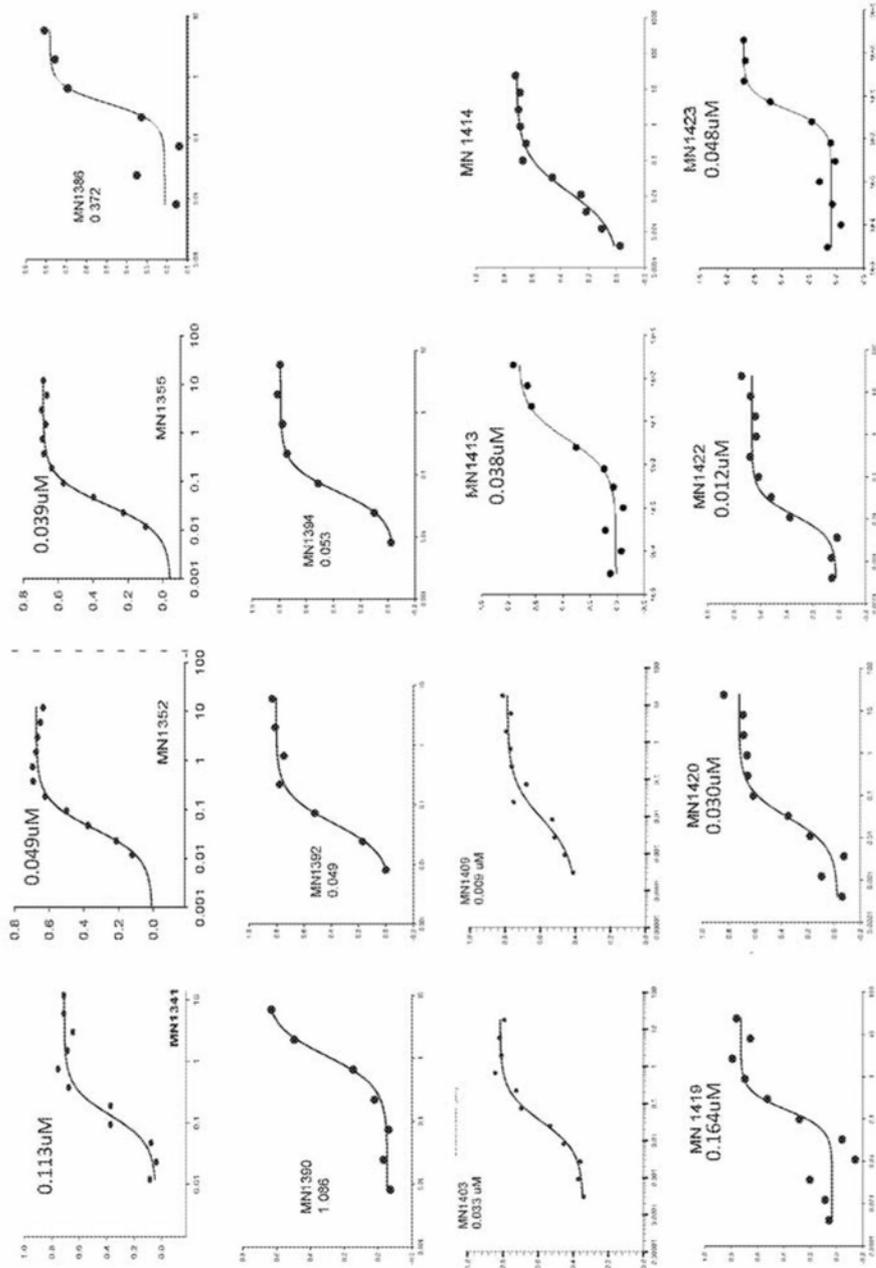


图79

120hr T47D迁移IC50值

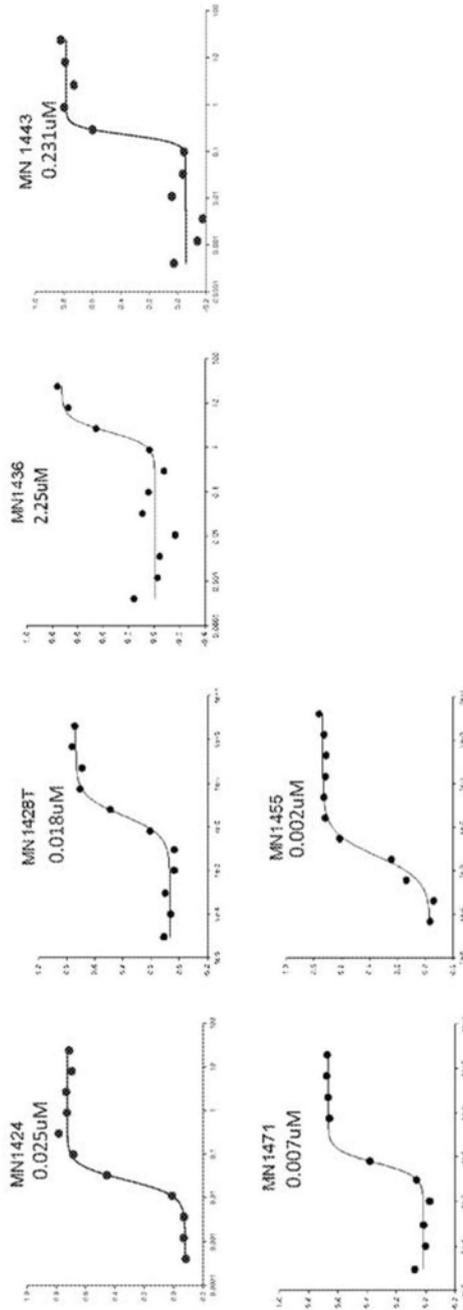


图80

加入指定浓度的化合物120hr后,抑制BT-474赫赛汀抗性 (BT-Res2) 乳腺癌细胞迁移

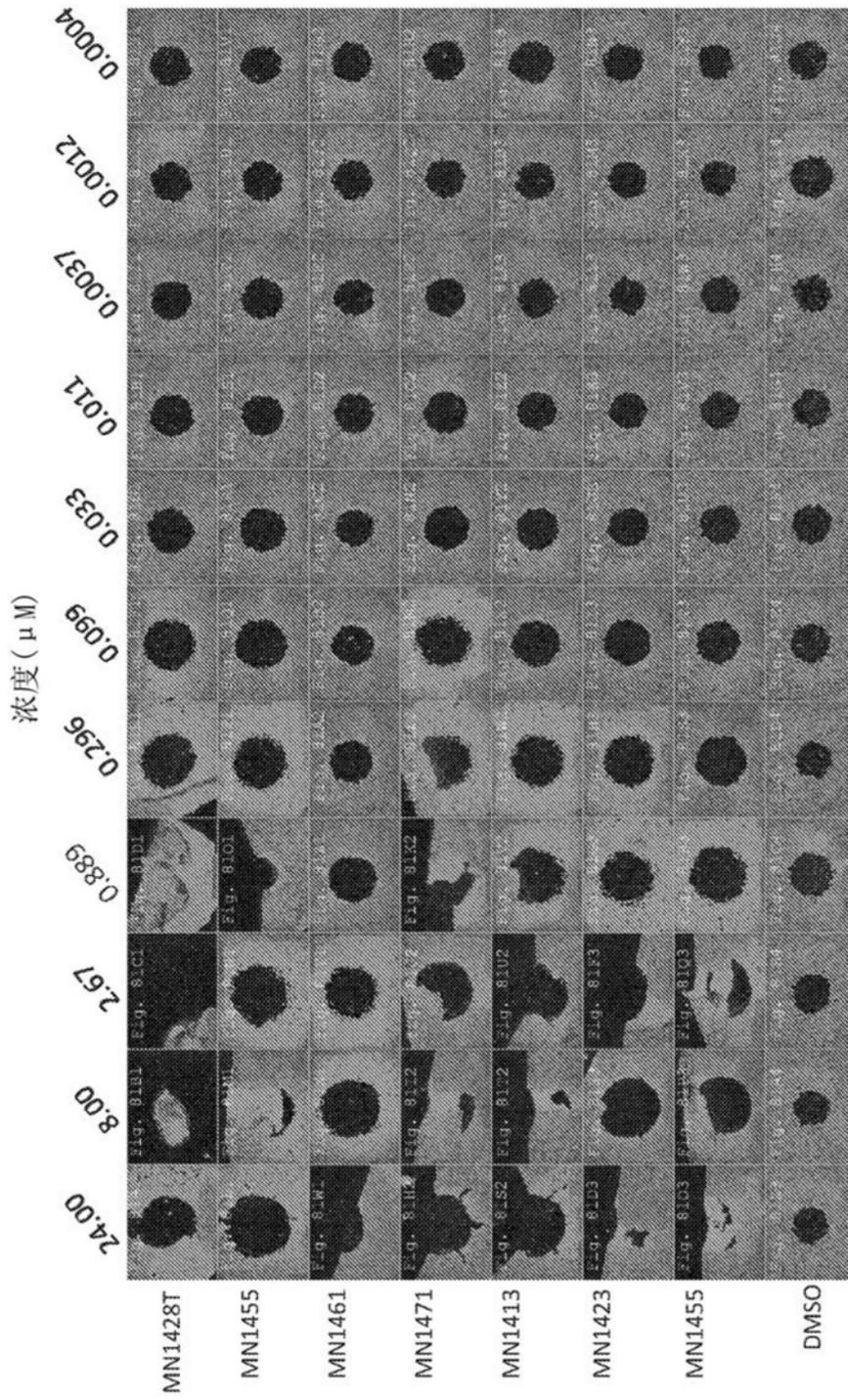


图81

120h IC50曲线BT-Res2

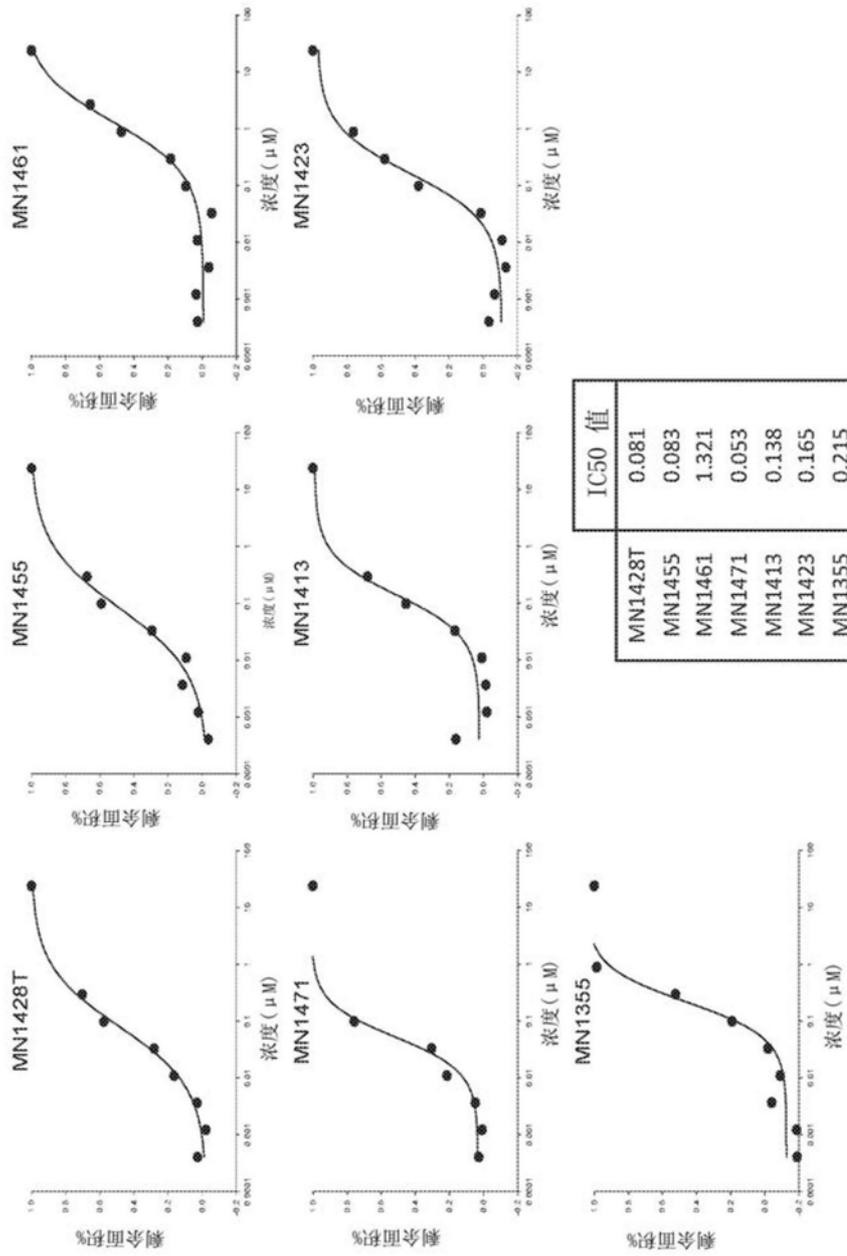


图82

加入指定浓度的化合物72hr后，抑制HCT-MUC1*癌细胞迁移

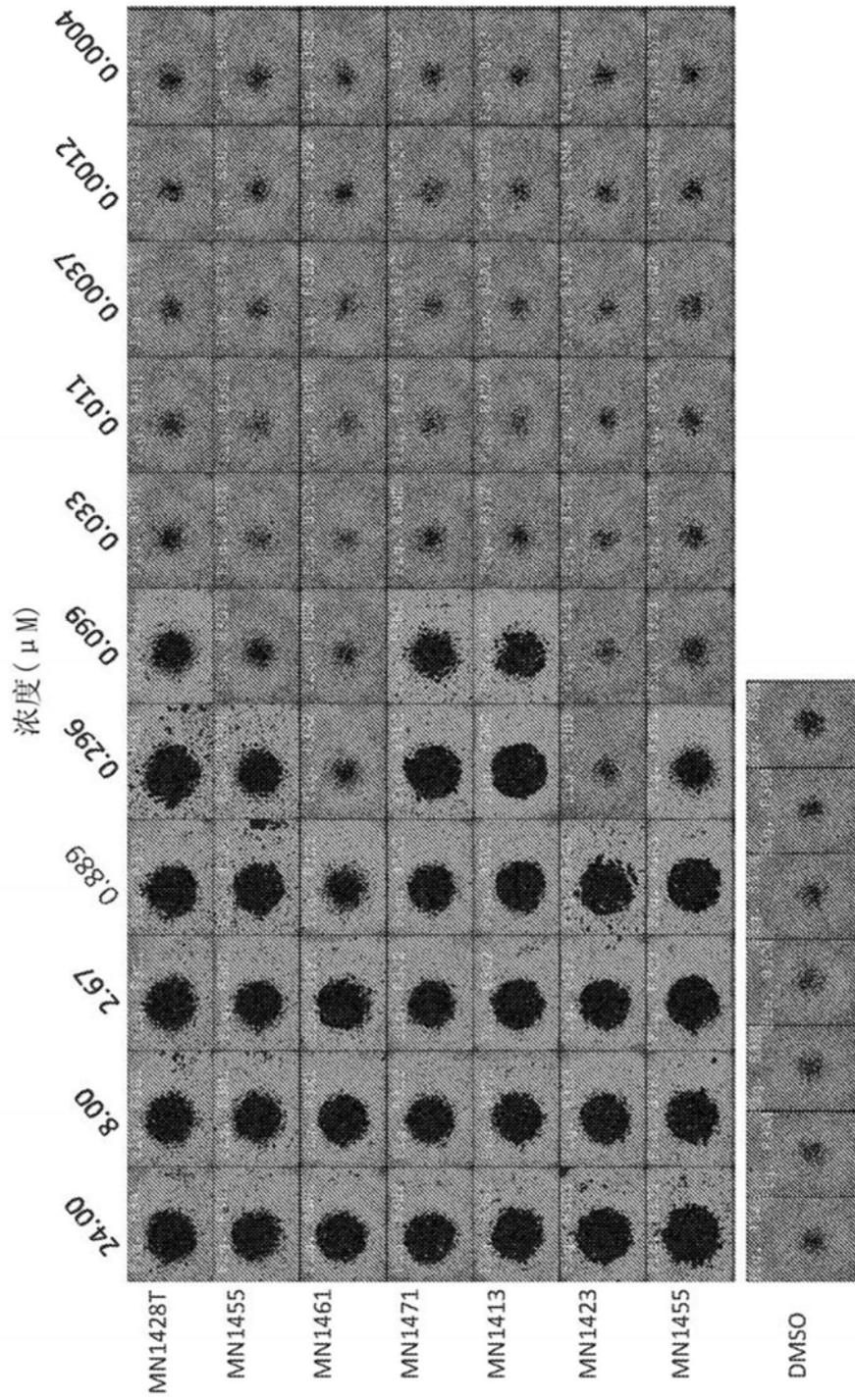


图83

72hr IC50 曲线 HCT-MUC1* 细胞

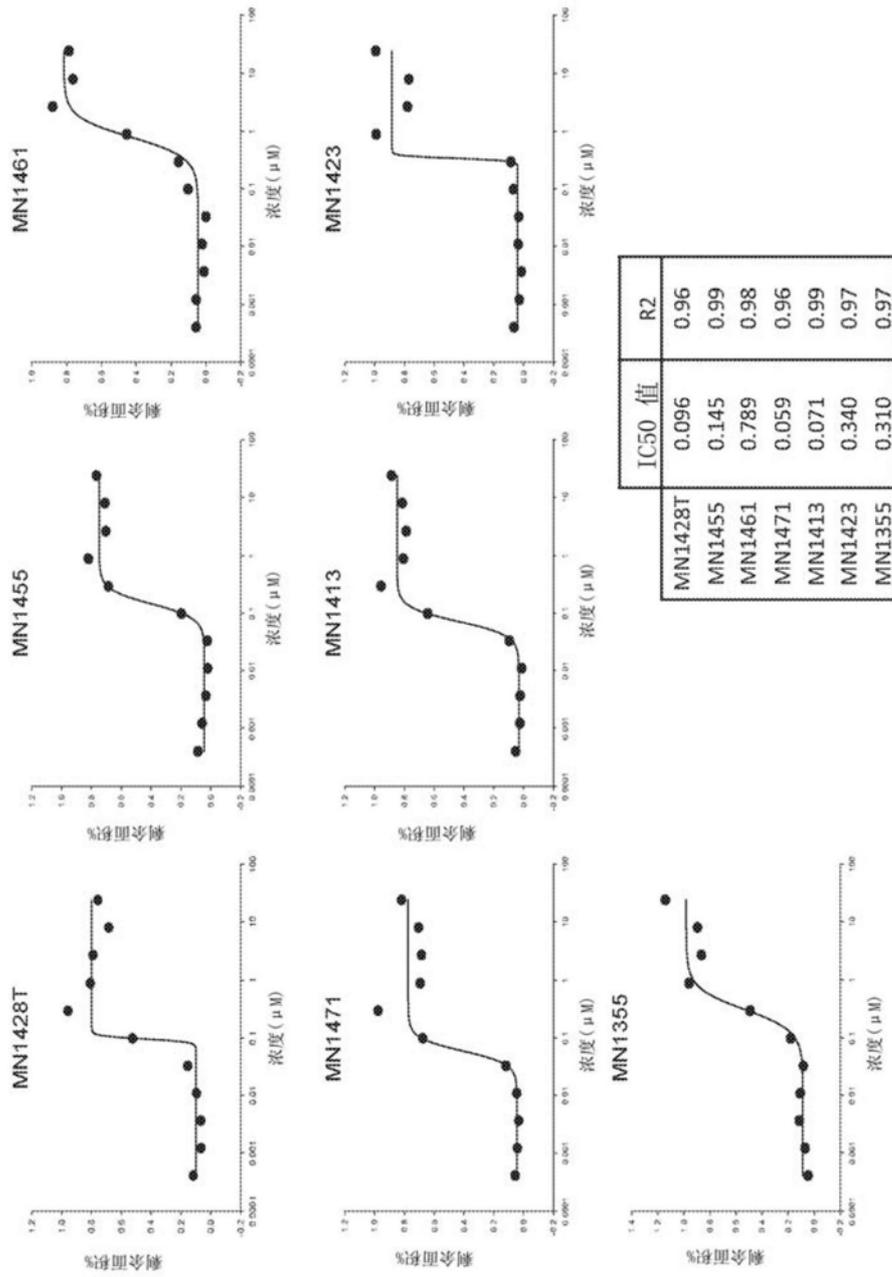


图84

加入指定浓度的化合物72hr后，抑制BT20三阴性乳腺癌细胞迁移

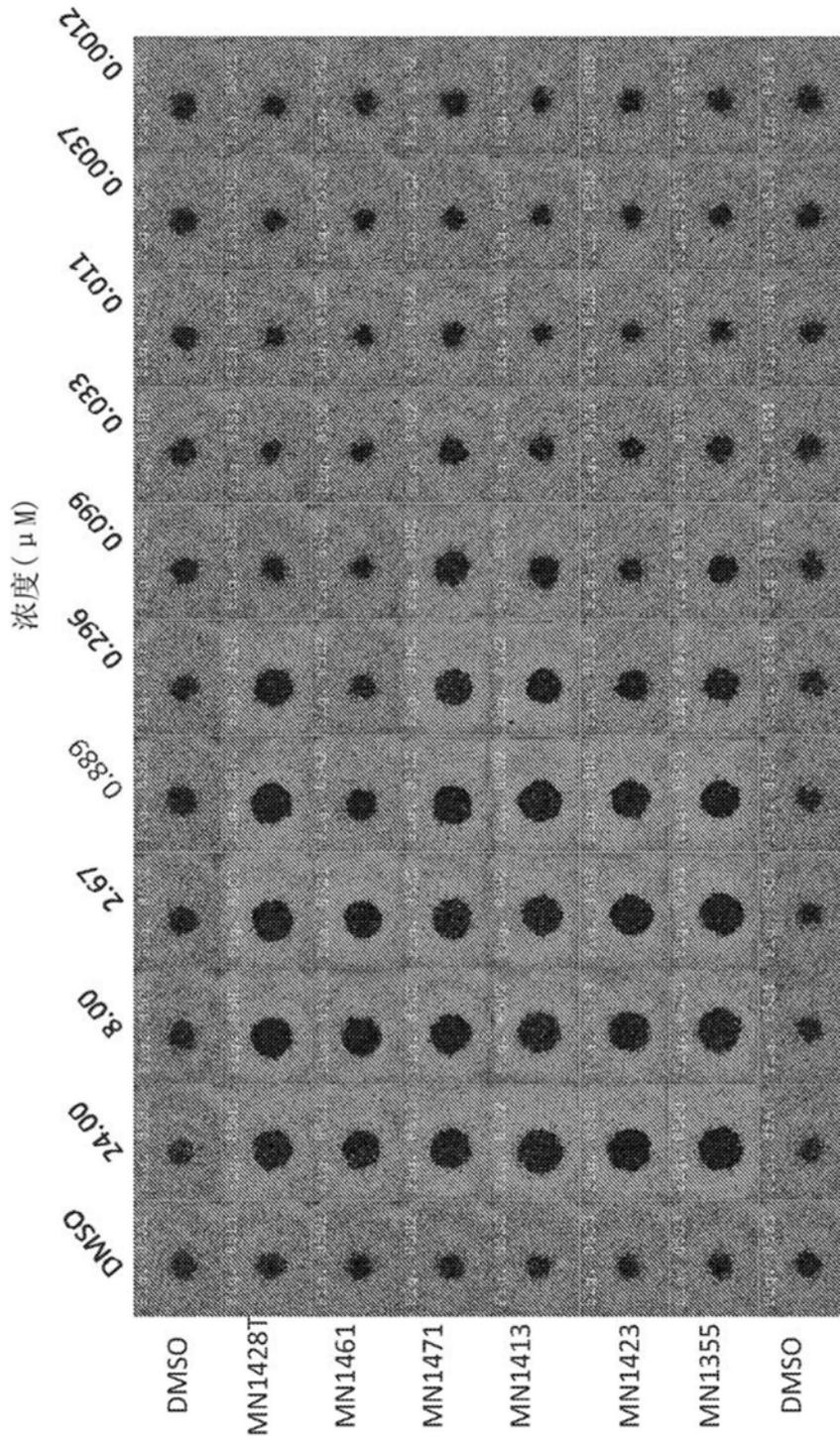


图85

72hr IC50曲线和值 BT20三阴性乳腺癌细胞

	IC50 值	R2
MN1428T	0.172	0.99
MN1461	1.046	0.99
MN1471	0.072	0.97
MN1413	0.180	0.95
MN1423	0.465	0.97
MN1355	0.407	0.99

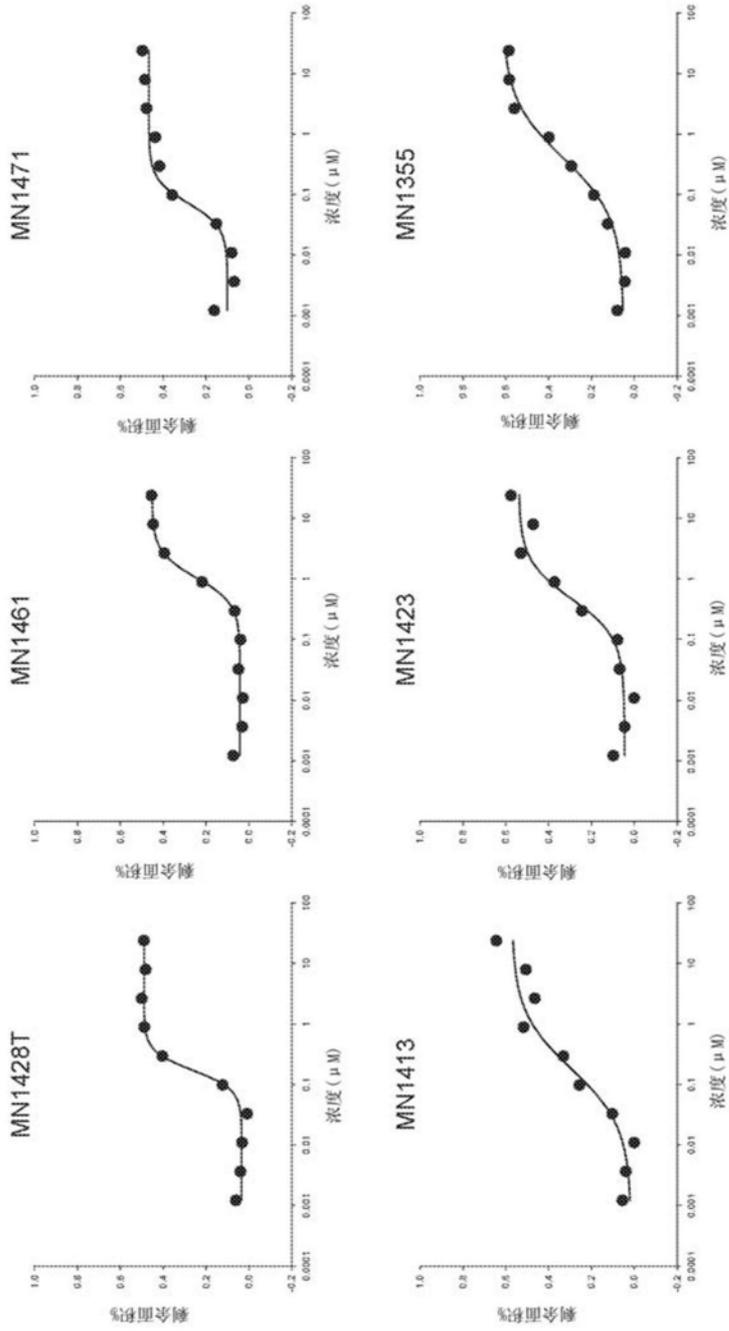


图86

加入指定浓度的化合物72hr后，抑制HCT-116MUC1阴性结肠癌细胞迁移

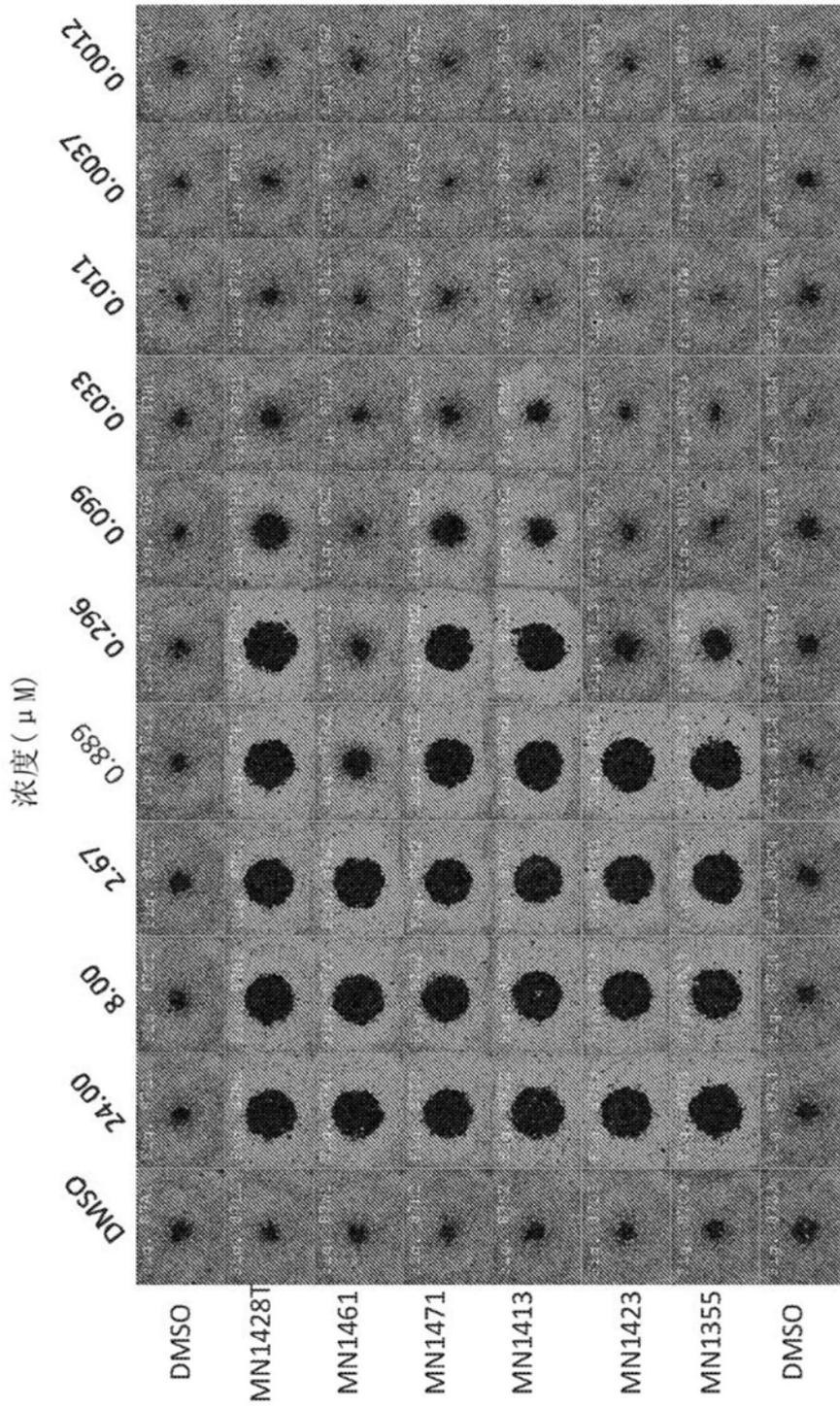


图87

72hr IC50 曲线 HCT-116 细胞

	IC50 值	R2
MN1428T	0.100	0.98
MN1461	0.932	0.99
MN1471	0.102	0.99
MN1413	0.105	0.98
MN1423	0.307	0.99
MN1355	0.357	0.98

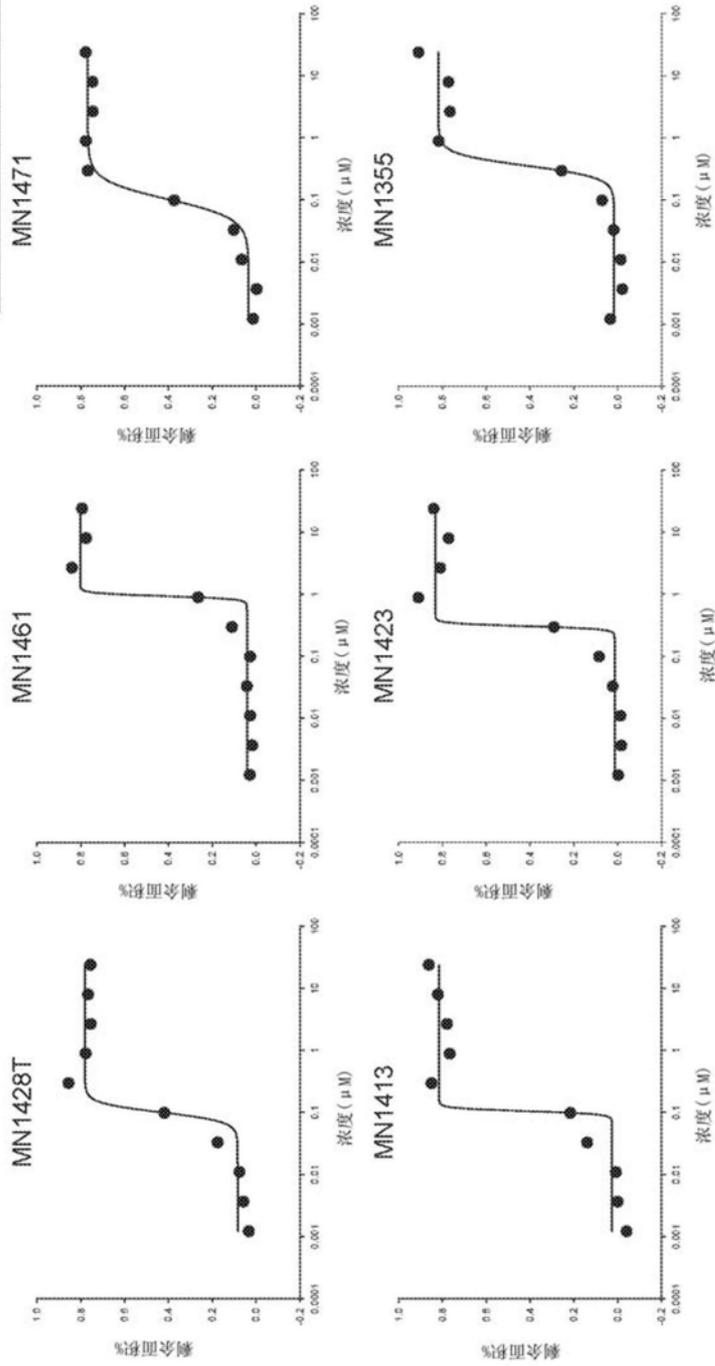


图88

幼稚干细胞-qPCR基因表达 (倍数变化)

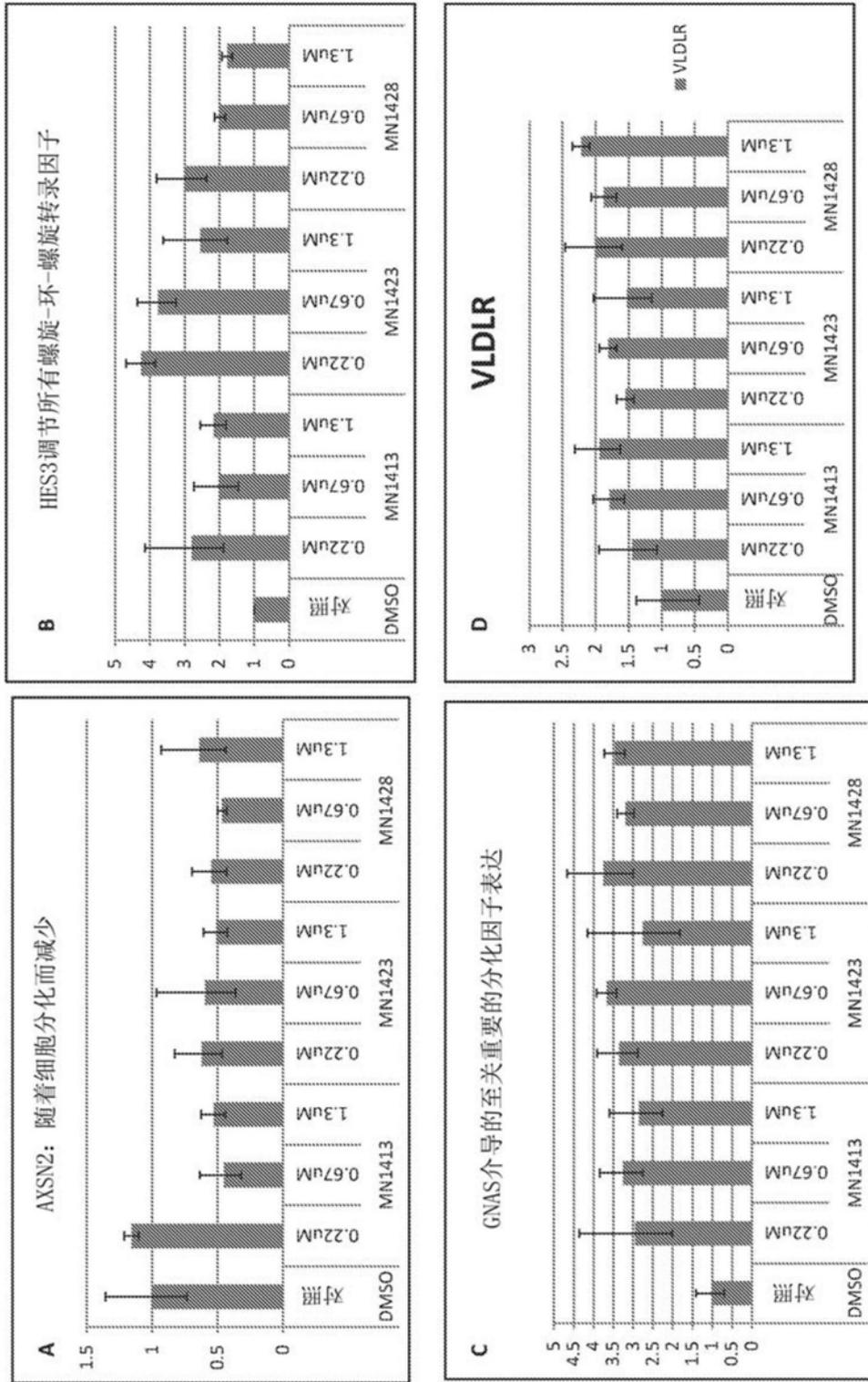


图89A-89D

幼稚干细胞-qPCR基因表达 (倍数变化)

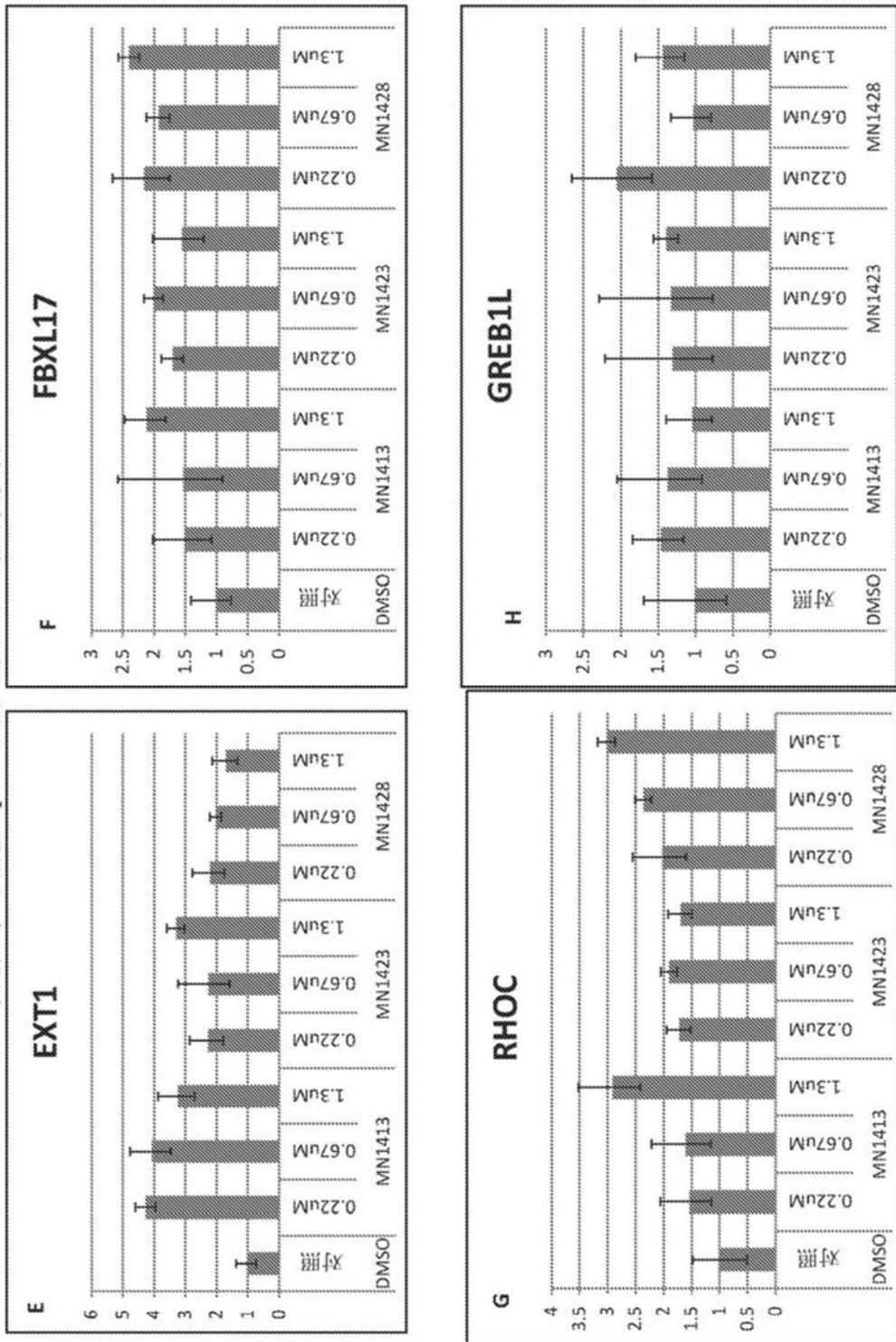


图89E-89H

HCT-116癌细胞-qPCR基因表达 (倍数变化)

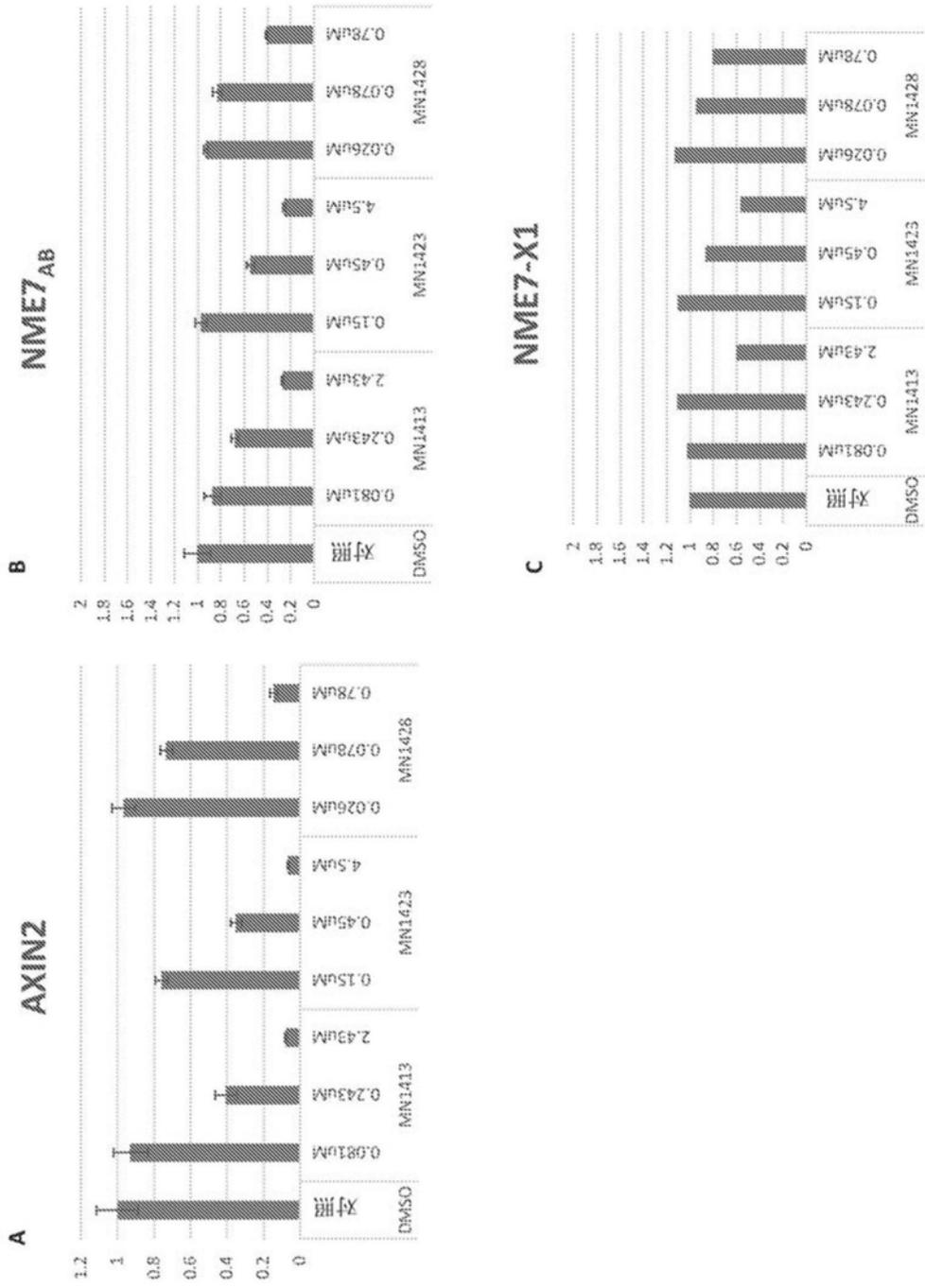
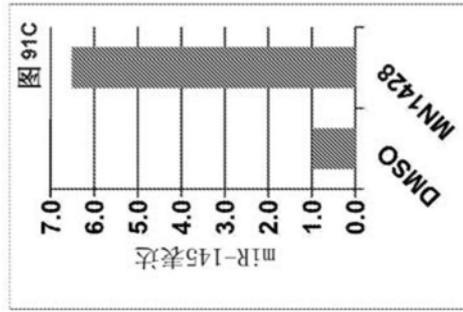
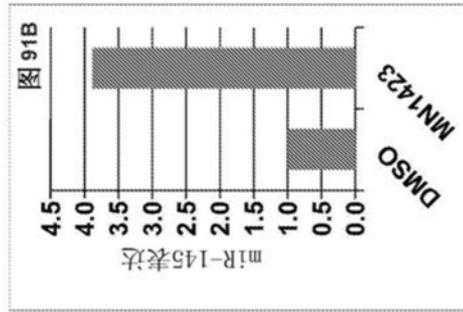
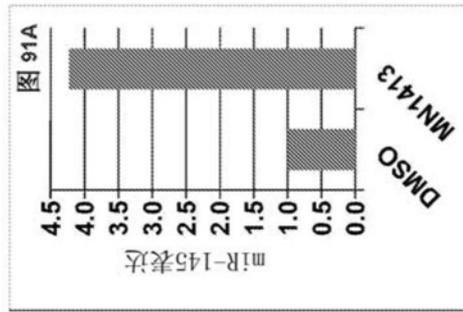


图90A-90C

本发明的化合物诱导miR-145在幼稚状态干细胞中的表达



本发明的化合物诱导miR-145在癌细胞中的表达
此处显示T47D乳腺癌细胞

